

## 再導入による希少鳥類の保全手法の確立に関する研究

### (3) ヤンバルクイナの飼育繁殖と再導入のための予備的研究

公益財団法人山階鳥類研究所

保全研究室 尾崎清明

平成25～27年度累計予算額：12,343千円（うち平成27年度：3,500千円）

予算額は、間接経費を含む。

#### [要旨]

ヤンバルクイナの保全のため、減少要因を解析して、主要な原因がマングースであることを解明した。その結果マングースの排除を最優先に進めるべきであることが明確となった。飼育繁殖個体を野外へ再導入する際に必要な情報を収集するとともに、再導入の効果を検証するための追跡技術と、再導入個体の管理のための捕獲技術の開発を行った。個体の追跡には小型電波送信機が不可欠で、その装着にはハーネス法が有効であることが判った。捕獲には両面扉のカゴ罠や、ボウネットが有効であり、個体の誘引には、各種の音声を組み合わせて状況に応じて用い、さらに天敵のハブのデコイを用いて誘引することで画期的な効果があることを発見した。これは天敵に対するモビング行動を応用したもので、行動学的にも興味深い課題である。野外への放鳥実験では、捕食によって初期死亡率が高いことが判明し、それを改善するには、放鳥個体の選択（若齢、自然ふ化、自然育雛など）、放鳥前の順化訓練、訓練とソフトリリースのための広い施設の必要性などが明確となってきた。

ヤンバルクイナに近縁な国外の無飛力のクイナ類の保全と再導入の状況を、現地調査で収集した。グアムクイナでは長期間の再導入の努力にもかかわらず、野外での個体数は増えていない。その原因は再導入環境に絶滅原因とは異なる外敵の存在があつて、それを排除する努力を優先的に行う必要があることを示している。一方で、外敵の排除を徹底して行ったロードハウ島では、短期間の保護増殖事業ながら成功を収めていて、ロードハウクイナは個体数が少ないながら、安定している。このように種によってその生息環境や減少原因は異なっているが、ヤンバルクイナの保全に役立つ情報が多く得られた。

#### [キーワード]

ヤンバルクイナ、再導入、捕獲技術、テレメトリー、モビング

#### 1. はじめに

日本で唯一の飛べない鳥類であるヤンバルクイナは、1981年に発見・記載された。当初からその分布域は限定されていて、個体数が少ないであろうことは予想された。1990年代になると、その分布域の南限で確認されなくなり、急激に分布域と個体数を減じてきた。2006年にはIUCNの飼育繁殖専門家グループが、このままでは25年で絶滅する可能性があるとして警鐘を鳴らした。幸い沖縄県や国によるマングース駆除事業の効果が現れてきて、近年では分布域や個体数に回復傾向が見られている。しかしながら、依然として安心できる状況ではない。そのため、まだ個体数が比

較的多いうちに、人工増殖や再導入の技術を確立しておくことが必要不可欠と考えられている。

こうした背景のもとで、この研究は再導入の技術や知見を増やすことを目的として計画された。

## 2. 研究開発目的

ヤンバルクイナの減少要因を解析し、再導入時に注意すべき項目を絞り込む。また、飼育個体を用いて、安全な誘引捕獲技術、および、発信機装着技術を確立し、捕獲効率を検証し、発信機による追跡手法の有効性を検証する。近縁クイナ（グアムクイナ、ニュージーランドクイナ等）の再導入事例を詳細に調査し、ヤンバルクイナに適用可能な飼育、再導入技術を抽出する。トキ、コウノトリの成果と近縁クイナ類から得られた情報をもとに、再導入確率を高めるのに最適な飼育個体群の管理手法を提案する。

## 3. 研究開発方法

### (1) ヤンバルクイナの減少要因の解析

ヤンバルクイナの減少要因解析のため関連資料を収集し、移入哺乳類の存在との関連を検証した。ヤンバルクイナの減少の主要な要因としては、移入された哺乳類であるマングース、ネコ、クマネズミの存在が考えられ、環境省や沖縄県の実施している移入種駆除事業の結果と、山階鳥類研究所と環境省が実施しているヤンバルクイナの調査結果をもちいて、それぞれの分布域とその経年変化との相関関係を検討した。ヤンバルクイナの南部地域からの分布域の減少と、マングースの捕獲結果による生息分布域の南部から増加は、地図上から相関していることが推測されたものの、ネコやクマネズミの分布域の変化はそれぞれ独自で、他との関連は明確ではない。

そこで、これら4種の分布域の関係を検証するため、年毎およびメッシュ（自然環境保全基礎調査用3次メッシュ、東西1.25km×南北0.925km）毎に、マングース、ネコ、ネズミの存在確率を独立変数、ヤンバルクイナの存在確率を従属変数としたロジスティック回帰式をもとめた。使用したデータは2000年から2008年までで、ヤンバルクイナに関しては尾崎<sup>1)</sup> 環境省<sup>2)</sup>、マングース、ネコ、ネズミに関しては、沖縄県および環境省<sup>3)</sup> による。

### (2) 安全な誘引捕獲・追跡技術の開発

捕獲・追跡技術の開発に関しては、飼育個体での発信機の装着方法の検証と同時に、野外における誘引効果の実験を行う。飼育個体は国頭村安田にある環境省ヤンバルクイナ飼育施設で飼育されているものを用いる。なお、本項目はNPO法人どうぶつたちの病院沖縄と共同研究した。

#### 1) 誘因効果実験

野外における誘因効果実験は、以下の項目に関して実施した。

- ・音声（ヤンバルクイナの成鳥各種の声やヒナの声スピーカーから流す）への反応
- ・エサ（生き餌、擬似餌）への反応
- ・ヤンバルクイナの型罠（デコイ）への反応
- ・天敵のハブの剥製への反応

## 2) 効果的な捕獲方法

捕獲方法については、以下の方法を実験した。

- ・金網の箱型トラップ（入口が片面と両面のもの）
- ・ボウネット（漁網を用いた地面に設置する自動わな）
- ・ねぐらにおいての直接捕獲（手法の検討のみで未実施）

## 3) 追跡技術の開発

### a. カラーリングによる個体識別

内径9.5mm、外径14mm、高さ10mmのプラスチック製カラーリングを2-3個用いて個体識別し、野外での視認性を検証した。

### b. 発信機の装着方法

発信機の装着方法は、テフロンリボンで背中に背負わせるハーネス型と、首の周りに装着する首輪型を検討した。発信機の重さは約15gで、Holohil 社製モデルR I-2CおよびR I-2BMである。

## (3) 飼育下で繁殖した個体の野外放鳥実験

飼育下で繁殖した個体に発信機を装着し、実際に安田家畜改良センター内にある国頭村が設置した野外のエンクロージャーである面積14haのクイナ自然の森（旧ヤンバルクイナ保護シェルター、以降、シェルターと略す）において、放鳥実験を行い、その結果を野生個体の追跡結果と比較した。

## (4) 近縁種のクイナ類との比較

グアムクイナ、ロードハウクイナ、ニュージーランドクイナおよびカラヤンクイナの保全と再導入状況について現地調査し、ヤンバルクイナに適応可能な技術を検討した。

## 4. 結果及び考察

### (1) ヤンバルクイナ減少要因

マングース、ネコ、ネズミの存在確率を独立変数、ヤンバルクイナの存在確率を従属変数としたロジスティック回帰式の解析結果は2000年から2008年のすべての年で有意な説明力を有しており、マングースのみがいずれの年もヤンバルクイナに有意な負の影響（ $\chi^2=5.02\sim 24.95$ ,  $0.025=p<0.001$ ）を及ぼしており相関があることが明確となった。一方、ネコとクマネズミに関しては明らかではなかった（表(3)-1）。すなわちマングースのいる場所にはクイナはいないという結果となった。ただし2004年のみは、ネコの効果も有意（ $p=0.013$ ）であった。

上記の結果から再導入時に注目すべき項目として、第一にマングースの排除が重要である。また再導入の成否を判断するためには、放鳥個体の生存確認や死因解析が重要であり、そのためにも発信機による追跡が不可欠であることが判明した。

表(3)-1 ヤンバルクイナとマングース・ネコ・クマネズミのメッシュごとの  
存在確率のロジスティック回帰分析結果

		2000年	2003年	2004年	2005年	2006年	2007年	2008年
モデル全体	$\chi^2$	28.9	13.04	49.75	15.9	28.17	11.35	20.58
	p	<0.001	0.005	<0.001	0.001	<0.001	0.01	<0.001
	R <sup>2</sup>	0.107	0.087	0.182	0.064	0.115	0.068	0.081
	n	195	124	213	180	179	121	187
マングース	$\beta$	-2.57	-1.79	-2.88	-1.48	-2.08	-1.36	-1.02
	$\chi^2$	16.54	5.02	24.95	12.74	23.67	9.01	6.69
	p	<0.001	0.025	<0.001	<0.001	<0.001	0.003	0.01
ネコ	$\beta$	0.12	-0.12	-0.96	-0.58	0.18	0.4	0.63
	$\chi^2$	0.15	0.06	6.13	1.88	0.13	0.38	1.8
	p	0.7	0.805	0.013	0.171	0.717	0.538	0.18
クマネズミ	$\beta$	-0.18	-0.5	0.69	0.47	0.62	0.15	0.51
	$\chi^2$	0.29	1.1	3.78	1.7	2.79	0.12	1.83
	p	0.591	0.294	0.052	0.192	0.095	0.734	0.18

## (2) 安全な誘引捕獲・追跡技術の開発

捕獲・追跡技術の開発に関しては、発信機の装着にはテフロンリボンのハーネスが有効であること、音声・擬似餌・ヤンバルクイナのデコイ・ハブの剥製による誘引にはいずれも効果が見られることが判明した。詳細は以下の通りである。

### 1) 誘因効果実験

野外における誘因効果実験では、音声（ヤンバルクイナの成鳥各種の声やヒナの声スピーカーから流す）による誘因効果は明瞭であり、ほとんどの場合音声を再生して5-10分で付近にヤンバルクイナが近寄ってきた。さらに音声の種類を10種類に増やし、鳥の反応を確認しながら、遠隔操作で適宜スピーカーから出す音の種類を選択して誘因効果を高め、かつ持続させることに成功した。

生き餌は鳥に見える状態で管理しておくことが困難で、十分な反応を確認できなかった。擬似餌（トカゲの模型）については、かなり明確な誘因効果が見られた。ヤンバルクイナのデコイについては、短時間の興味を持たせることはできるものの、その効果は長続きせず、捕獲効率を高めるには至らないことも判明した。これはデコイが動かないため、偽物であることが見破られ誘引効果が薄れることによると考えられた。

天敵であるハブの剥製を導入した。これは鳥類の天敵に対するモビング行動を利用したもので、長時間の誘因効果があることが判明した（図(3)-1）。これらの音声とハブの剥製による誘因で、ヤンバルクイナを効率良く捕獲することが可能となった。なお、このモビング行動は野生個体と飼育下繁殖個体とでは、反応の強さと持続時間、他個体への警戒声等で異なる可能性が、予備的

な実験で認められた。また、ハブは本来の動きも比較的ゆっくりしているためか、偽物と見破られるまでに相当時間を要するため、誘引効果が持続するものと考えられた。

また、ハブと同様にヤンバル地域に生息し、ヤンバルクイナの天敵であるアカマタの剥製も用いて誘引実験を行った。誘引効果は認められたが、ハブほど強くはなかった。それはアカマタの剥製がハブに比べて小型であったことが原因しているのか、種類による違いなのかは検証できず、今後の課題となった。



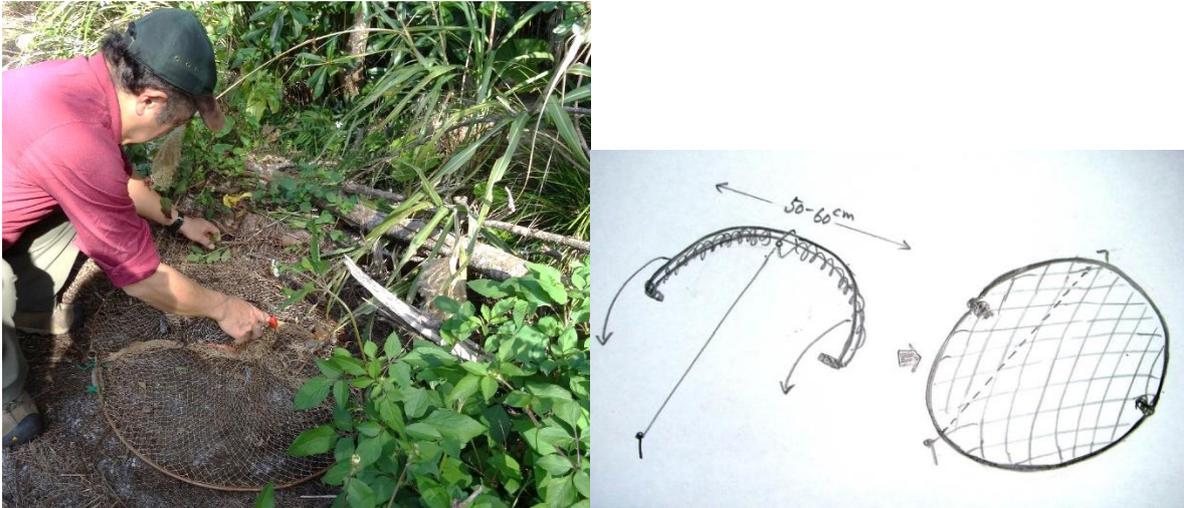
図(3)-1 ハブの剥製にモビング行動を見せるヤンバルクイナ

## 2) 効果的な捕獲方法

捕獲方法については、金網のかご罠の扉が両面のものは片面のものに比べて捕獲効率が優れていた(図(3)-2)。ボウネットは開けた場所での捕獲に適していることが分かった(図(3)-3)。ねぐらにおいての直接捕獲は、夜間のねぐら個体に手捕りするほど至近距離に近づくことは困難であり、捕獲にはタモ網やくくり罠などの道具が必要ながわかった。有効で安全な手段としては、ライチョウを捕獲するのに用いられている、釣竿の先にワイヤーの輪をつけたものを首にかける方法が適応できるのと考えられた。



図(3)-2 片面扉のかご罠(左)と両面扉のかご罠(右)



図(3)-3 ボウネット（自動無双網）による捕獲

### 3) 追跡技術の開発

#### a. カラーリングによる個体識別

個体識別を実施したのは、野生46個体、飼育放鳥14個体の計60個体であり、これらのうち発信機装着が25個体、発信機無しが35個体である。放鳥後にカラーリングによって個体識別されたのは、12個体で、直接観察によるのが5個体、自動撮影カメラによるのが9個体（2個体は双方で確認）であった(図(3)-4)。このことからヤンバルクイナは直接観察によって個体識別することが困難な種類であることが判る。自動カメラなど補助的な器具を用いても、その確認率の合計は20%（12/60）に留まっている。



図(3)-4 樹上で峙する個体識別されたヤンバルクイナ

## b. 発信機の装着方法

前項のように、ヤンバルクイナは直接観察して個体識別することが困難であり、個体の生存確認や行動圏の把握には、小型発信機による追跡が不可欠である。もちろん発信機の装着は鳥体に安全なものでなければならない。一般にクイナ類は体が扁平で、植物の繁茂している環境を潜り抜ける生態があることから、発信機の装着と安全性を保つことは困難と予想された。

そこで、飼育個体によって発信機の装着方法の実験を実施した。テフロンリボンで背中に背負わせるハーネス型23個体と、首輪型3個体の合計26個体を用いた。

### i. ハーネス型

野生放鳥実験に当たっては、より安全で鳥体への影響が少なく、かつ一定期間で脱落するような装着方法の開発が必要であり、皮膚への損傷の程度など鳥体への影響検証と脱落までの期間について知見を得るため、飼育個体に装着し、継続的に観察を行った（図(3)-5, 図(3)-6）。



図(3)-5 ハーネスの交点は木綿糸で縫い合わせ、糸の劣化によって発信機が脱落する



図(3)-6 発信機とカラリングを装着し、飼育下で状態を観察

### 【実施個体および発信機装着日】

2012年10月11日；3個体（個体番号SB91、SB92、20120426）

2014年2月2日；2個体（SB64、SB86）

2014年3月15日；1個体（SB63）

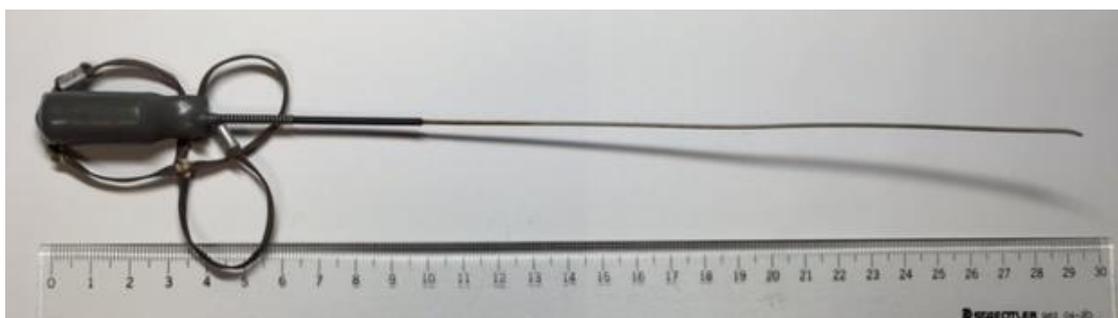
2014年11月28日；4個体（SB75、SB80、SB89、SB96）

2015年7月26日；6個体（SB103、SB106、SB107、SB108、SB109、SB121）

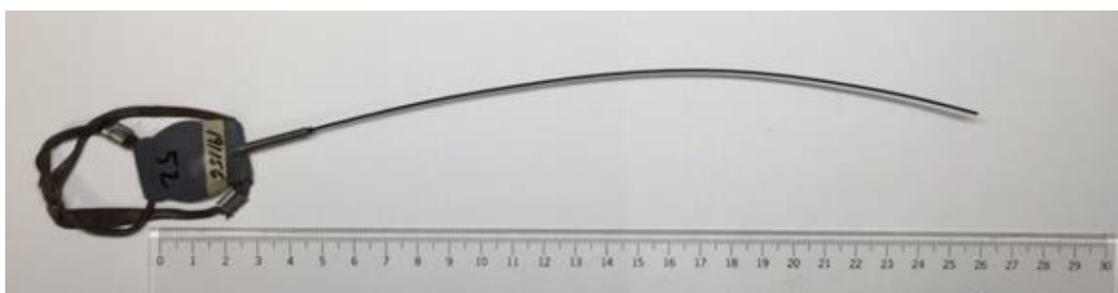
2015年12月8日；7個体（SB56、SB70、SB89、SB92、SB99、SB101、SB122）

#### 【発信機】

Holohil社製、モデルR I -2C(15g) (図(3)-7)、および、R I -2BM(15g) (図(3)-8)



図(3)-7 モデルR I -2C



図(3)-8 モデルR I -2BM

#### 【発信機装着後の経過】

装着期間や脱落までの期間、装着状況などは、一覧として表(3)-2に示してある。

SB91 装着日：2012年10月11日

約1年5ヶ月が経過した2014年3月1日時点では、装着による鳥体への影響はほとんどなく、リボンの摩耗もみられない(図(3)-9)。



図(3)-9 装着場所の羽毛の状況

その後、装着から約2年7ヶ月後の2015年5月18日に、カシメ部分のテフロンリボンが

擦り切れて脱落した。

表(3)-2 ハーネス型発信器装着試験結果

	装着日	脱落日	脱落までの期間	装着状況	備考
SB 91	2012年10月11日	2015年5月18日	約2年7か月	良好	カシメ部分のテフロンリボンの摩耗が進み、擦り切れて脱落
SB 92	2012年10月11日	-	10日	擦過傷	装着解除
20120426	2012年10月11日	2013年7月28日	約9ヶ月1週間	良好	
SB 64	2014年2月2日	-	20日	皮膚炎	装着解除→再装着し野生復帰試験へ→死亡
SB 86	2014年2月2日	-	-	良好	野生復帰試験中に死亡
SB 63	2014年3月15日	試験中		良好	2016年1月28日 テフロンリボンの摩耗が進む
SB 89	2014年11月28日	-	-	良好	装着解除
SB 96	2014年11月28日	-	-	良好	野生復帰試験中に死亡
SB 80	2014年11月28日	-	-	良好	装着解除
SB 75	2014年11月28日	-	-	良好	野生復帰試験中に死亡
SB 103	2015年7月26日	-	-	良好	装着解除
SB 106	2015年7月26日	野生復帰試験中		良好	
SB 107	2015年7月26日	野生復帰試験中		良好	
SB 108	2015年7月26日	-	-	良好	野生復帰試験中に死亡
SB 109	2015年7月26日	野生復帰試験中		良好	
SB 121	2015年7月26日	野生復帰試験中		良好	
SB 56	2015年12月8日	野生復帰試験中		良好	
SB 70	2015年12月8日	-	-	良好	野生復帰試験中に死亡
SB 89	2015年12月8日	野生復帰試験中		良好	
SB 92	2015年12月8日	-	-	良好	装着解除
SB 99	2015年12月8日	-	-	良好	装着解除
SB 101	2015年12月8日	-	-	良好	野生復帰試験中に死亡
SB 122	2015年12月8日	-	-	良好	野生復帰試験中に救護・装着解除

SB64 装着日：2014年2月2日→20日後に外した

2月14日、背部の発信機周囲に脱羽がみられた。翌15日捕獲し、発信機周囲の皮膚に強い炎症お

よび肥厚を確認した。また、両脇にはテフロンリボンの摩擦により皮膚の発赤が見られた。皮膚炎の治療として抗生剤の投与を開始し経過観察とした。しかし、徐々に皮膚の損傷は悪化がみられ、自傷行為に発展する可能性が見られるため、2月21日、ハーネスを一旦外した。現在は発毛もみられ皮膚は回復してきている(図(3)-10)。



2月14日

2月21日ハーネス外す

2月26日皮膚回復中

図(3)-10 発信機装着による炎症の経過観察

SB86装着日：2014年2月2日

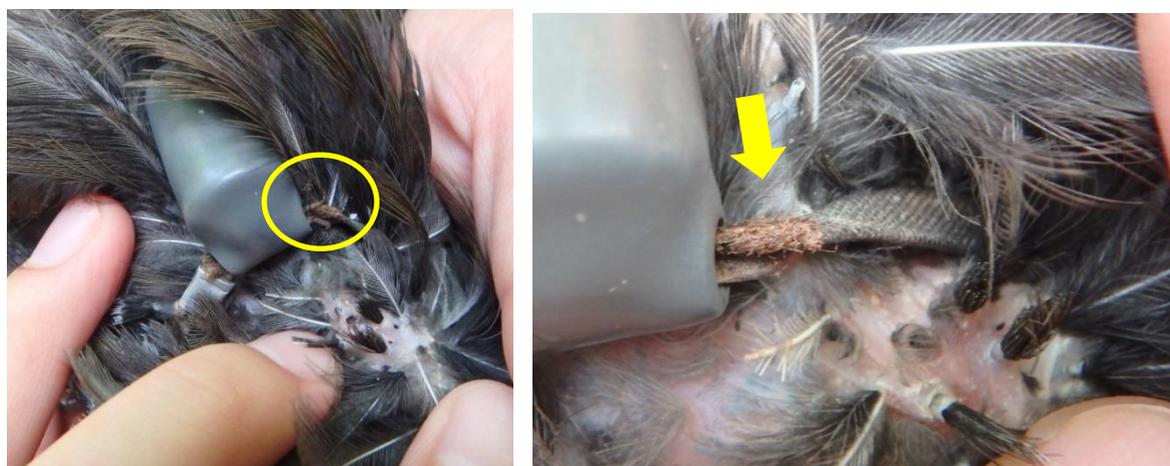
2014年3月1日まで、目立った損傷や脱羽はなく、装着状態は良好である(図(3)-11)。2014年3月14日に野外放鳥実験をし、20日後に死亡(カラスの捕食)。



図(3)-11 いずれも3月1日の皮膚の状態

SB 63装着日：2014年3月15日

SB 63は装着して約1年11ヶ月後に、左肩のテフロンリボンに摩耗が進んでいることが確認されたが、装着状態は良好である(図(3)-12,13)。



図(3)-12 発信機に接する部分のテフロンリボンに摩耗が見られる(2015年8月10日)



図(3)-13 さらに摩耗が進んでいる (2016年1月28日)

### 【評価】

ハーネス型の装着は、一部個体に脱羽がみられるものの軽度であり、2年ほど経過しても良好な状態を保っている個体もいる。また、1例ではあるが、2年7ヶ月後に自然脱落した個体も確認された。電池寿命が2年間の現在の発信機を用いる場合に適切な期間での脱落と考えられる。これらハーネスへの反応には個体差があることに留意して用いれば、発信機の装着方法としては適していると考えられる。

### ii. 首輪型

#### 【発信機の形状】

首輪型発信機は、キジ・ウズラ・ライチョウなど地上性鳥類、オウム等用に開発されたもので、中国ではトキにも使用された実績がある（たとえばHolohil社のRI-2D, SI-2Cなど）。頸部に首輪状に装着し、発信機部分は首の前側に下がり、アンテナは背中側にのびる(図(3)-14)。首輪の太さは頭骨より狭くて脱落しない必要があるが、頸部を締め付けないことも重要である。



図(3)-14 首輪型発信機

【結果】 いずれの個体も装着後まもなく首輪部分に下嘴を挟み、自力では首輪型発信機をはずすことができない状態であった(図(3)-15)。以下に各個体の装着後の状況を示す。

①SB82 (♂) 装着時間：12：10→嘴を挟んだ時間：15：36 (約3時間)

実験終了後、舌の先端に小規模の擦過傷が認められた。また、嘴の上下においてズレが認められた。食欲および活力に変化はない。その後、嘴のズレは徐々に改善してきている。

②SB80 (♂) 装着時間：12：30→嘴を挟んだ時間：14：38 (約2時間)

首輪をはずした直後は舌にわずかな傷が見られたが出血は認められなかった。2月7日より日中における食欲低下がみられるが、1日を通しての採餌量に大きな減少は見られない。

③SB84 (♀) 装着時間：12：50→嘴を挟んだ時間：16：47から17：50：の間 (約4-5時間)

首輪をはずした直後、舌の前方半分に出血を伴う擦過傷が認められた。食欲および活力に異常は見られない。



SB82 (♂)

SB80 (♂)

SB84 (♀)

図(3)-15発信機首輪に下嘴を挟んだ個体

#### 【評価】

今回の形状の首輪型発信機は、装着後間もなく下嘴を首輪部分に挟み込み、自力では外せない状態となった。このことから、ヤンバルクイナへの発信機の装着方法としては適さないと考えられる。

### (3) 飼育下で繁殖した個体の野外放鳥実験

#### 1) 野外放鳥実験結果

飼育下で繁殖した個体に発信機を装着し、実際にシェルター（野外エンクロージャー）に放鳥する実験を行った(図(3)-16)。その結果を同時期に周辺地域で実施した安田野生個体の追跡結果および西銘岳で実施した調査結果（2003-2008年、尾崎2010）と比較し、表(3)-3にまとめた。



図(3)-16 シェルターへの野外放鳥実験

表(3)-3 野外放鳥実験と野生個体の生存日数比較

	シェルター内実験	安田野生個体	西銘岳野生個体
発信機による追跡個体数	14	10	32
平均生存日数（生存中を含む、2016/1/31までで計算）	82.5日	315.5日	—
平均生存日数（死亡個体、発信機の電池切れも含む）	29.8日	330.5日	399日 (電池寿命2年のみの25個体では459)
1ヶ月以内の死亡率	8/14 (57.1%)	0/10(0%)	1/32(3%)
死亡原因 カラスなど鳥類	5		7
ハブ	2	2	3
ネコ		1	
不明		1	2
その他	1(衰弱水死)	2(電池切れ?)	1(ハーネス)

#### a. 生存日数

シェルター内に放鳥した14個体の生存日数は平均82.5日（0-228日、2016年3月31日現在までで計算）となった。他の調査との比較のため、死亡確認個体のみで計算すると、29.8日となる。この値は安田の野生個体（330.5日）や、西銘岳の野生個体（399日）と比較すると、極めて短いことが判明した。

#### b. 死因と死亡率

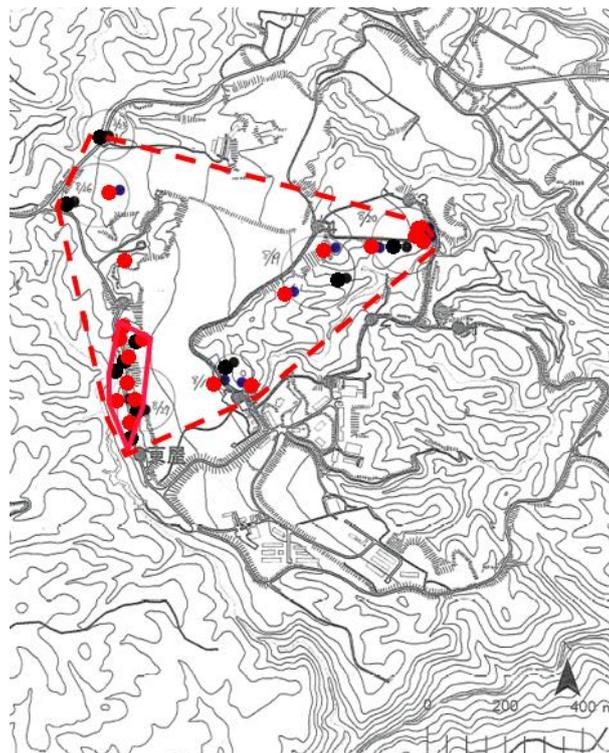
合計8個体の内訳は、カラスや猛禽と推定されるものが5個体、ハブが2個体、溺死が1個体となった。死因としては、野生個体と類似しているが、1ヶ月以内の死亡率が57.1%と高いことも分かった。すなわち、飼育下繁殖個体をシェルター内に放鳥すると、短期間のうちに外敵によって捕食され死亡し、野生個体に比べて生存することが困難であることが確認された。

#### c. 長期生存個体

20日以上生存した個体は14羽中6羽であり、42.9%となる。これを放鳥時の年齢別にみると、1歳未満では6羽中4羽（66.7%）であるのに対し、2歳以上では8羽中2羽（25%）であり、長期生存には放鳥時の年齢が関与している可能性がある。また、孵化と育雛形態の違いによる長期生存率は、自然・自然個体が8羽中4羽（50%）、人工・人工個体が6羽中2羽（33.3%）となり、これも関与している可能性がある。

#### d. 行動圏

放鳥後数日間は行動圏が安定せず、比較的長距離の移動を繰り返し、その後特定の場所に行動圏を構える個体が多かった(図(3)-17)。このことは放鳥直後には採餌や縄張り行動に費やす時間が多かったことを示すものと考えられ、今後の再導入時の訓練の必要性に関する重要な情報である。



図(3)-17 野外放鳥実験個体の行動圏の一例（点線：全期間、実線：放鳥10日～4ヶ月後）

## 2) 再導入確率を高める飼育個体群の管理手法（提案）

### a. 初期生存率の向上

シェルター内試験放鳥個体では、平均生存日数が短く、特に初期の死亡率が高い。すなわち初期生存率が極めて低いため、これを高めることが重要である。その主要な死亡原因は捕食であることも判明している。そのために考えられる手法は、以下のものが考えられる。

#### i. 放鳥候補の選別の再考

放鳥時の年齢、孵化と育雛形態の違いが、長期生存率に関与する可能性があるので、これらを考慮し、再検討する。具体的には、若齢個体や自然孵化・自然育雛を優先するなど。またこれらと放鳥時期の組み合わせについても様々なパターンを実施し、実証的により効果的な放鳥時期を見つける。

#### ii. 野外順化訓練の実施

（捕食）：飼育の一部個体でハブに対する反応実験を行い、反応には個体差があることも判明している。また野外ではハブの出現にたいして、親鳥が威嚇を示すと同時に雛へ危険を教育するような行動が観察されており、ハブからの危険回避には本能に加えて「教育」が必要な可能性がある。このメカニズムを研究解明するとともに、順化訓練の手法を検討、実施する。

（採餌）：自然環境下で、給餌に頼らない餌の探索、摂取の訓練。

（他個体関係）：複数個体との競合、回避、共存などを経験させる必要がある。そのためには、現在の飼育施設のケージでは面積が狭く、十分な効果が期待できない。もう少し広いケージ（必ずしも恒久的でなくても可）が必要である。

### iii. リリース方法の検討

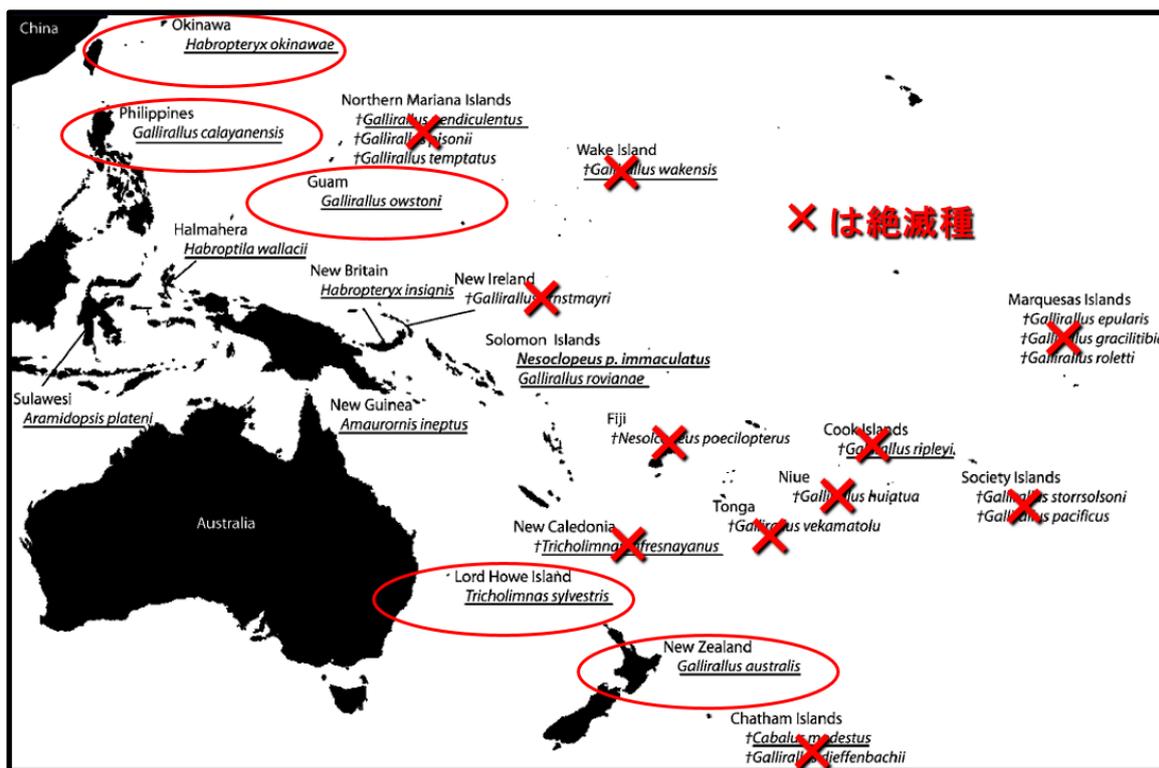
上にあげた捕食、採餌、他個体関係などのストレスを一気にかけることは生存へのプレッシャーとなる危険性がある。したがって、これらを段階的に経験・習得していくために、効果的なリリース方法を検討する必要がある。例えば、前項の順化訓練を兼ねた一時的なケージを設置して、その中からソフトリリースするなど検討してはどうか。

### b. 追跡と放鳥実験の継続

これらまで課題を検証するために、現在追跡中の個体（6個体）の追跡を継続して、データを収集する。また、実験個体数を増やすことにより、より正確なデータを蓄積していくことが重要である。

## （4）国外の近縁クイナの保全と再導入状況についての現地調査

捕食者の生息していない島嶼性のクイナ類では胸筋が発達せず飛翔力がなくなるため、絶滅しやすいことが知られている。太平洋でも11種の無飛力のクイナ類が絶滅している（図(3)-19）。ヤンバルクイナに近縁と考えられる南太平洋に分布するガムクイナ、ロードハウクイナ、ニュージーランドクイナおよびカラヤンクイナの保全と再導入状況について現地で調査した。ヤンバルクイナと近縁種の保全・再導入状況を表(3)-4にまとめた。



図(3)-19太平洋諸島の無飛力クイナの分布図(Kirchman 2012 4)を改変)

○ : 調査対象種、× : 絶滅種

表(3)-4 ヤンバルクイナと近縁種の保全状況

種名	ボトルネック (年)	個体数	増減傾向	保護策
ヤンバルクイナ	720 (2005)	野生1,500 飼育70	増	外来種、人工増殖
グアムクイナ	21 (1983)	野生130 飼育170	増	外来種、人工増殖、別の島に放鳥
ロードハウクイナ	30 (1980)	250	増減なし	モニタリング (人工増殖は中断)
ニュージーランドクイナ	?	160,000 飼育100	増減なし	外来種、人工増殖、再導入
カラヤンクイナ	?	3,000?	減	保護区設定、啓蒙

### 1) グアムクイナ

グアムクイナの飼育増殖と再導入状況を、2013年9月～10月に、グアム島（本島とココス島）、ロタ島の現地で調査した。このプロジェクトはグアム政府農業局魚類野生生物部門が主導しており、再導入はグアムクイナの減少の原因となった外来ヘビがいない、サイパンのロタ島とグアム属島のココス島で実施されている。ロタ島ではこれまで23年間に1,200羽を放鳥しているが、安定した個体数の定着には至っていない。主な原因はネコなどの外敵の存在と好適環境の確保が困難なことと考えられている。これに比べてココス島での移入実験はまだ年数や個体数も少ないが、順調な定着が見られており、この両地域の条件を詳細に比較検討することで、定着の要因が判明する可能性がある。

### 2) ロードハウクイナ

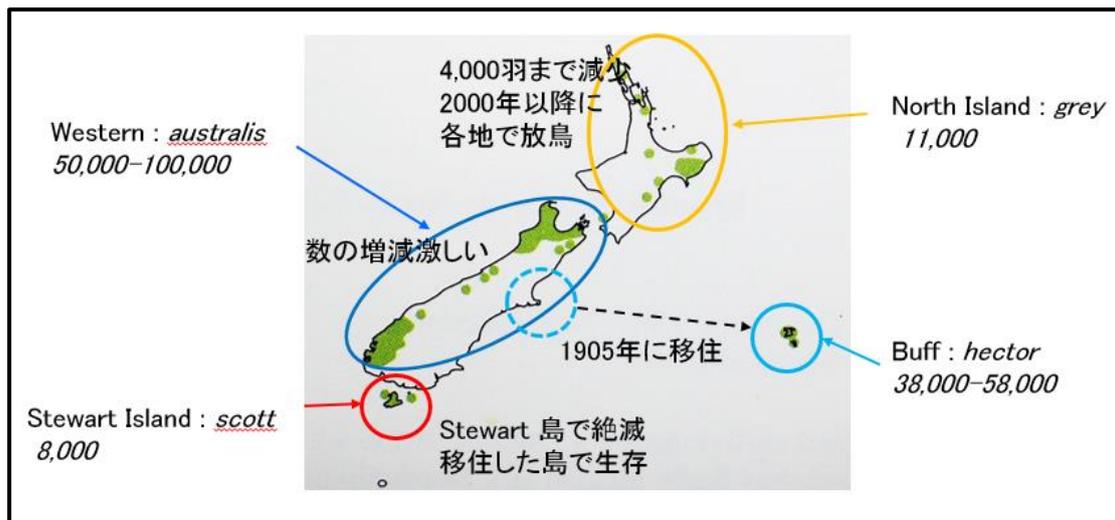
オーストラリアの南東に位置するロードハウ島に生息するロードハウクイナに関しては、2013年11月に、ロードハウ島担当局が実施する生息状況モニタリング調査に参加した。この調査はロードハウ島生物多様性管理計画に基づくもので、毎年11月に島の全域ですべての観察個体を捕獲し、カラーリングによる個体識別を実施することにより、正確な個体数の把握を目指している。今回の調査では、216個体を確認し、推定される50個体を加えて、266個体と計算された。これは2012年の280個体よりやや減少したことになる。ロードハウクイナは保護増殖事業を短期間に終了し、個体数は少ないながら綿密なモニタリングを継続することで、保全状況を確認している。万一急激な個体数減少の兆候が認められたら、すぐに対策を講じることとなっている。一方でこれまで遺伝的な解析は行っておらず、今回現地の研究者との情報交換から、ロードハウクイナに関する遺伝的多様性の研究の重要性が認識された。

### 3) ニュージーランドクイナ

ニュージーランドクイナの野外生態調査と再導入状況を2014年9～10月に調査した。ニュージーランドクイナは4亜種の合計が11-18万羽と推定されているが、もっとも少ない亜種は8千羽に満

たず、種として絶滅危惧Ⅱ類に指定されている(図(3)-18)。主な減少原因は環境悪化、交通事故、外来哺乳動物による捕食圧等で、ヤンバルクイナの現状に類似している。外来哺乳動物のコントロールを進めるとともに、積極的に好適な環境へ移住するプロジェクトも行われ、効果を上げつつある。なお、ニュージーランドでは、外来種問題の啓蒙が浸透して、一般市民にも広く認識されており、ボランティアベースの駆除等も盛んに実施されている。

これまでニュージーランドクイナの遺伝的な解析は不十分であり、今後亜種間の相違や、個体群毎の遺伝的多様性など解明すべき課題がある。これらに関して、ヤンバルクイナとも比較研究していくことは有意義と考えられた。



図(3)-18 ニュージーランドクイナの亜種ごとの個体数。総数では107,000-177,000羽と推定

#### 4) カラヤンクイナ

フィリピン・ルソン島の北にあるカラヤン島に生息するカラヤンクイナの生息状況の確認と、保全状態を、2015年9月に調査した。その結果、カラヤンクイナに関しては、分布域や個体数、その他の生態に関する知見も限られており、保全に関しては密猟の取り締まりや啓蒙が重要であることが分った。また、生態や遺伝的な特徴に関して、ヤンバルクイナと比較研究していくことが必要かつ有意義と考えられた。

### 5. 本研究により得られた成果

#### (1) 科学的意義

1) ヤンバルクイナの主要な減少要因がマングースの存在であることが、ロジスティック回帰分析結果として明確に示された。

2) ヤンバルクイナの誘因に、天敵であるハブの剥製に対するモビング行動が有効なことが明白となった。また、このモビング行動はこれまで記録のない興味深い行動であり、野生個体と飼育下繁殖個体とでは、反応の強さと持続時間、他個体への警戒声等で異なることが、予備的な実験で認められ、ヘビに対する警戒行動の一部が後天的である可能性を示唆した。

<行政がすでに活用した成果>

小型発信機の装着方法はすでにヤンバルクイナ保護増殖事業で、野生復帰個体に用いられている。

<行政が活用することが見込まれる成果>

野生復帰個体の選択に、若齢、自然ふ化、自然育雛個体等を用いる手法、野生順化訓練の実施。

## (2) 環境政策への貢献

1) ヤンバルクイナの主要な減少要因がマングースの存在であることが明確に示された。これはすでに沖縄県や環境省が実施しているやんばる地域での外来種対策事業（平成18年度以降の環境省事業名は「沖縄島北部地域ジャワマングース等防除事業」）の目的を裏付けると同時に、再導入時に最も注目すべき項目が、マングースの排除であることを示している。

2) 効果的な誘引方法と、安全な捕獲技術の開発が進んでおり、ハーネス法による発信機装着技術もかなり確立した。これらは再導入個体のモニタリングをするうえで重要な技術である。

3) ヤンバルクイナの再導入には、天敵や新たな環境への順化訓練が重要であることを示す結果が得られた。すなわち、トキの野生復帰事業で確認されたような、ハードリリースとソフトリリースの相違、飼育繁殖形態の相違が、放鳥後の生存率に及ぼす影響が、ヤンバルクイナにも存在する可能性があり、そのための順化訓練など環境を整えることが必要と考えられた。

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) A. NICOLA, C. Y. CHOI, K. OZAKI, C. A. LEPCZYK. J. Ornithology, Vol. 156, Supplement 1:199-207. (2015) Invasive species and Pacific island bird conservation: A review of recent research featuring case studies on Swinhoe's Storm Petrel and Okinawa and Guam Rail.

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 尾崎清明：レッドデータブック2014、環境省自然環境局野生生物課（編）、44-45（2014）  
「ヤンバルクイナ」

### (2) 口頭発表（学会等）

- 1) 尾崎清明：ジャパンバードフェスティバル、見にレクチャー（2013年11月2日、我孫子市）  
「ヤンバルクイナとグアムクイナの最新情報」
- 2) 尾崎清明：環境省主催、ヤンバルクイナ保護増殖事業ワークショップ（2013年12月15日、国頭村）  
「ヤンバルクイナの生態」

- 3) 尾崎清明：東邦大学理学部野生生物保全研究センター設立記念シンポジウム「希少鳥類の未来を考える」（2014年3月8日、習志野市）「飛べない鳥、ヤンバルクイナの保全」
- 4) K. OZAKI & S. MEDINA: 26<sup>th</sup> International Ornithological Congress, Tokyo, Japan, 2014  
“Impact of Invasive Predators on Okinawa and Guam Rails.”
- 5) 尾崎清明・永田尚志：日本鳥学会2015年度大会（神戸）「ヤンバルクイナとその近縁種の保全状況」

### (3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

### (4) 「国民との科学・技術対話」の実施

尾崎清明：日本生態学会2015年度大会（仙台）自由集会：希少鳥類の再導入生物学、現状と問題点、「ヤンバルクイナの保護増殖と野生復帰試験」

### (5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 山梨日日新聞（2014年1月3日、8ページ、「ヘビ侵入で急減、絶滅の危機、米グアムに飛べない鳥」）
- 2) 長崎新聞（2014年1月3日、9ページ、「ブラックバスやヘビ、退治するのは大変、飛べない鳥を守るグアム政府」）
- 3) 岐阜新聞（2014年1月4日、8ページ、「壊れる固有の自然環境、飛べない鳥、絶滅危機ーグアムクイナ」）
- 4) 北日本新聞（2014年1月5日、「退治するのは大変、100万匹に増えたヘビ、グアム」）
- 5) 信濃毎日新聞（2014年2月27日夕刊、4ページ、「戻り始めたヤンバルクイナ、沖縄 進む天敵の外来種捕獲」）
- 6) 日本経済新聞（2014年3月1日、全国版、34ページ、「絶滅危惧種、沖縄のヤンバルクイナ生息域回復」）
- 7) 熊本日日新聞（2014年3月1日夕刊、3ページ、「ヤンバルクイナ戻る、天敵マングース減少」）
- 8) 西日本新聞（2014年3月4日夕刊、3ページ、「ヤンバルクイナ踏ん張る、沖縄の危惧種個体数回復」）
- 9) 京都新聞（2014年3月7日夕刊、7ページ、「ヤンバルクイナ生息回復、天敵マングース捕獲効奏」）
- 10) 琉球新報（2014年9月12日、地方版、「動物・植物の話題、ヤンバルクイナ仲良く寝支度」）

### (6) その他

特に記載すべき事項はない

## 8. 引用文献

- 1) 尾崎清明: 東邦大学大学院理学研究科博士学位論文, (2010), ヤンバルクイナの保全生物学的研究.
- 2) 環境省那覇自然環境事務所. 2009a. 平成20年度ヤンバルクイナ生息状況及び生態等把握調査業務報告書
- 3) 環境省那覇自然環境事務所. 2009b. 平成20年度沖縄島北部地域ジャワマンゲース等防除報告書
- 4) J. J. KIRCHMAN: *The Auk*: January 2012, Vol. 129, No. 1, 56-69. (2012), Speciation of Flightless Rails on Islands: A DNA-Based Phylogeny of the Typical Rails of the Pacific.

#### 4-1302 再導入による希少鳥類の保全手法の確立に関する研究

##### (4) 希少鳥類の遺伝子プロファイルと再導入に関する研究

新潟大学

自然科学系 生命・食料科学専攻 山田 宜永

自然科学系 生命・食料科学専攻 杉山 稔恵

<研究協力者>

京都大学

農学研究科 応用生物学専攻 祝前 博明

平成25～27年度累計予算額：13,854千円（うち平成27年度：4,500千円）

予算額は、間接経費を含む。

#### [要旨]

希少鳥類の野生下への再導入を成功させるためには、近親交配による遺伝的多様性の消失を阻止することが重要な課題となっている。そこで、飼育個体群と野生個体群において、SNP、マイクロサテライトなどの中立遺伝子とMHC、DRD4等の適応度遺伝子に分けて遺伝子情報を解析し、遺伝子プロファイルの完成、遺伝的多様性の評価、行動形質、繁殖適応形質との関連の解析を行った。本研究では、第1に、野外サンプルを用いた遺伝子解析手法の確立に関する研究を行い、トキの野外出生個体の遺伝的多様性をモニタリングできる高収量DNAを抽出するためのサンプリング法を確立した。第2に、マイクロサイトの多型情報の収集および遺伝的多様性の評価に関する研究を行い、日本産トキ集団において遺伝的多様性のレベルは低く、ボトルネックにより生じた結果であると示唆された。また、始祖個体をもつゲノムが、集団レベルで等しく後代個体に伝わっており、個体レベルでも様々な混合パターンで伝達していると示唆され、計画交配は遺伝的多様性の維持に有効に機能していると考えられた。第3に、MHC領域のゲノム構造の解明、多型情報の収集および遺伝的多様性の評価に関する研究を行い、トキではクラスII領域約40kbの、コウノトリではMHC約160kbのゲノム構造を決定した。多形解析では、トキ始祖5個体でハプロタイプが3種類のみであるのに対し、コウノトリ始祖6個体からは9種類が検出され、トキ集団の多様性が低いことが示された。第4に、DRD4のゲノム構造の解明、多型情報の収集、遺伝的多様性の評価および行動形質や生活史形質との関連に関する研究を行い、日本産トキ集団においてDRD4は4種類のハプロタイプしか保有していないことを明らかにした。また、DRD4は移動分散行動、採餌行動を介して生存率に影響すると示唆された。第5に、SNPの多型情報の収集および遺伝的多様性の評価に関する研究を行い、トキにおいて5万を超えるSNP候補と162のマイクロサテライト候補を得た。トキ集団の遺伝的多様性については、ゲノム全域にわたり各座位でのアリル数は2～3であることが示唆された。

#### [キーワード]

希少鳥類、中立遺伝子、適応度遺伝子、遺伝子プロファイル、遺伝的多様性

## 1. はじめに

希少鳥類の個体数を増加させ、野生復帰を果たすためには、飼育個体群と野生個体群の遺伝的多様性の維持や、近親交配の回避および遺伝的適応の最小化を目指した遺伝的管理を行うことが不可欠である。また、野生下への再導入を成功させるためには、放鳥個体の生存率や定着成功率を向上させる必要もある。このような生活史形質には、行動形質や繁殖適応形質が影響することが知られている。こうして、遺伝的多様性の評価や行動形質、繁殖適応形質との関連の解析を行うためには、SNP、マイクロサテライトなどの中立遺伝子、および生存、繁殖、行動形質に影響するMHC、DRD4等の適応度遺伝子の遺伝子プロファイルを完成させる必要がある。

## 2. 研究開発目的

飼育個体群と野生個体群において、ハプロタイプ、SNP、マイクロサテライトなどの生存に影響を与えない中立遺伝子とMHC、DRD4等の生存、繁殖、行動に影響する適応度遺伝子に分けて遺伝子情報を解析し、遺伝子プロファイルの完成、さらには遺伝的多様性の評価、行動形質、繁殖適応形質との関連の解析を行う。そのために、(1) 野外サンプルを用いた遺伝子解析手法の確立に関する研究、(2) マイクロサイトの多型情報の収集および遺伝的多様性の評価に関する研究、(3) MHC領域のゲノム構造の解明、多型情報の収集および遺伝的多様性の評価に関する研究、(4) DRD4のゲノム構造の解明、多型情報の収集、遺伝的多様性の評価および行動形質や生活史形質との関連に関する研究、(5) SNPの多型情報の収集および遺伝的多様性の評価に関する研究を行う。

## 3. 研究開発方法

### (1) 野外サンプルを用いた遺伝子解析手法の確立に関する研究

トキ野外回収サンプルからのDNA抽出法の確立については、当サンプリング法の予備的実験のため、白色レグホーン系採卵鶏（ジュリア）のヒナの雌雄各10羽を自由給水、自由給餌下で飼育した。0、5、10、15、20、25、30日齢時に体重測定を行い、その後ランダムに雌雄各3羽を選び、15、20、25、30日齢時に各個体より3本の胸部の羽髓をもつ幼羽を採取した。予備的実験後、当手法の有効性を確認するため、15～27日齢時のトキヒナ9個体（雄6個体、雌3個体）を用いて、15～21日齢時のトキヒナの胸部および、15～27日齢時のトキヒナの背部より羽髓をもつ幼羽を採取した。また、10か月、21か月および22か月齢時のトキ4個体（雄2個体、雌2個体）を用いて、胸羽を採取した。このように採取された胸部あるいは背部の幼羽、胸羽より、DNeasy Blood&Tissue Kitの改変プロトコルを用いてゲノムDNA抽出を行った後、分光光度計にてA260の吸光度の測定を行い、抽出されたDNAの収量について検討した。また抽出したDNAの品質の確認を行うために、性判定用のコントロールプライマー（ニワトリDNAについては、CPE15F：AAGCATAGAAACAATGTGGGACおよびCPE15R：AACTCTGTCTGGAAGGACTT、トキDNAについては、NNsexicF：GGAGGATGACAACACTACATCGTCTおよびNNsexicR：GGAGACAGTCTGGATCCCATT）並びに性判定用のプライマーであるNNsexicFおよびNNsexicRおよび30ng DNAテンプレートをを用いたPCR増幅を行った後、3%アガロースゲル電気泳動により、DNA収量の品質の確認を行った。

### (2) マイクロサイトの多型情報の収集および遺伝的多様性の評価に関する研究

中立多型であるマイクロサテライトについての遺伝子プロファイリングについては、2000年～

2012年に生まれた現存集団188個体（雄97個体、雌91個体）の尿漿膜および血液より、DNeasy Blood & Tissue Kitを用いてゲノムDNA抽出を行った。その188個体の集団は、123個体（雄64個体、雌59個体）の飼育下集団および65個体（雄33個体、雌32個体）の放鳥下集団より構成されていた。これらのDNAを用いて、19個のマイクロサテライトマーカー（9個：トキ由来マーカー、8個：クロツラヘラサギ由来マーカー、1個：ベニヘラサギ由来マーカー、1個：アメリカトキコウ由来マーカー）をPCR増幅した。得られたPCR産物について、ABI3730xl DNA analyzer（Applied Biosystems社）を用いて電気泳動を行い、マーカー型タイピングを行った。GeneScan™-500LIZ™ size standard（Applied Biosystems社）30μlとHi Di Formamide 1mlを混合した溶液10μlに、3つのPCR産物をそれぞれ0.7μl加え、泳動サンプルとして用いた。泳動後、Gene Mapperプログラムにより解析し、マーカー型を判定した。シーケンサーABI3730xl DNA analyzerによるタイピングでは3つのマーカーを同時に解析した。3つのマーカーの組み合わせは、Nn26・PM228・Nn17、Nn25・Nn04・Aaju02、Nn21・Wsu13・PM216、Nn18・Nn12・PM220およびPM313・PM229・PM117という5つの組み合わせであった。残りの4つのマーカーNnNF5・Nn01・PM221・PM237は、4つのPCR産物を0.7μlずつ加える方法により併せて解析した。多型が確認されたマーカーについて、マーカー座間の連鎖不平衡（LD）の状態の解析をGENEPOP version 1.2により行った。多重検定における補正のため、Bonferroni法を用いた。遺伝的多様性に関するパラメーターとして、アレル多様度（A）、アレル頻度、ヘテロ接合率の観察値（Ho）および期待値（He）、有効アレル数（ $n_e$ ）、多型情報量（PIC）をEXCEL MICROSATELLITE TOOLKIT version 3.11 (<http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/>)により計算した。また、ハーディー・ワインベルグ平衡（HWE）の検定をGENEPOP version 1.2により行った。検定はマルコフ連鎖モンテカルロアルゴリズムに基づいて行い、パラメーターセットをdememorization:1000、Batches:100、Iteration per batch:1000のように設定した。多重検定での補正を行う上ではBonferroni法を用いた。さらに、個体レベルでの遺伝的類縁関係を推定するために、MICROSATELLITE ANALYZER version 4.05により、共有アレル率に基づく個体間の遺伝距離（Dps）を計算し、PHYLIP version 3.69 (<http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>)のNEIGHBORプログラムにより樹形図を作成した。作成された樹形図はMEGA6 version6.0のTREE EXPLORERプログラムにより編集を行った。

### （3）MHC領域のゲノム構造の解明、多型情報の収集および遺伝的多様性の評価に関する研究

多型性が高く、抗病性・交配相手の選択に関わる主要組織適合遺伝子複合体（MHCクラスII遺伝子多型）の遺伝子プロファイリングについては、はじめにトキMHCクラスII領域のゲノム構造の解析を実施した。ラムダファージベクターを利用してトキゲノムライブラリーを作製し、MHC-IIB遺伝子のエクソン2を増幅するプライマー（2F\_pen1：AACGGCACCGAGCGGGTGAGGTおよびintron2-01R：GGGCTTGGCTTGCCCATCC）を用いてPCR法によるスクリーニングを行った。得られた陽性クローンの両端の配列を基に新たなプライマーを合成し、ゲノムウォーキングによりコンティグを作製した。次に、MHCクラスII遺伝子について全塩基配列の決定を行った。トキMHCクラスII領域の多様性については、中国政府から寄贈された始祖5個体（A-E）を対象として、サザンロット法およびPCR-RFLP法による解析を実施した。これらの解析結果に基づき、各トキ個体のMHCクラスII領域のハプロタイプ型を決定するためのPCR-RFLP法を開発した。

コウノトリ主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラスII領域のゲノム構造の解析では、1羽の個体(始祖個体B)の血液サンプルよりゲノムDNAを精製し、ラムダファージベクターを使用してゲノムライブラリーを作製した。他の鳥類の配列を基に作製したMHC-IIB遺伝子 (IIBexon4-F1 : AGACGGAGCGCGTGGTGTCCACおよびIIBexon4-R1 : GAAGAGCCCCAGCGCCAGGAAG )、TAP1遺伝子

(TAP1exon7-F1 : GCCCAGGGTAGGAGAACCAおよびTAP1exon7-R1 : GCCCAGGGTAGGAGAACCA) およびTNXB遺伝子 (TNXB-S1 : GTGCACCTCCACCCGGTACAおよびTNXB-A1 : GTGGCCCGTGCCATCCTCTC)を増幅するプライマーを用いて、PCR法によるスクリーニングを行った。各遺伝子を含む陽性クローンの末端配列を基に新たなプライマーを合成し、ゲノムウォーキングによりMHC領域をカバーするコンティグを作製した。コンティグを構成する各ファージクローンについては、制限酵素地図の作製およびプラスミドベクターへのサブクローニングを実施した。さらにサブクローンの両端の塩基配列を決定し、ホモロジー検索により遺伝子の検出およびアノテーションを行い、ゲノム構造を決定した。次に、日本コウノトリ集団に対して寄与の大きな始祖6個体(A-E)を対象として、MHCクラスII領域の多様性についての解析を実施した。

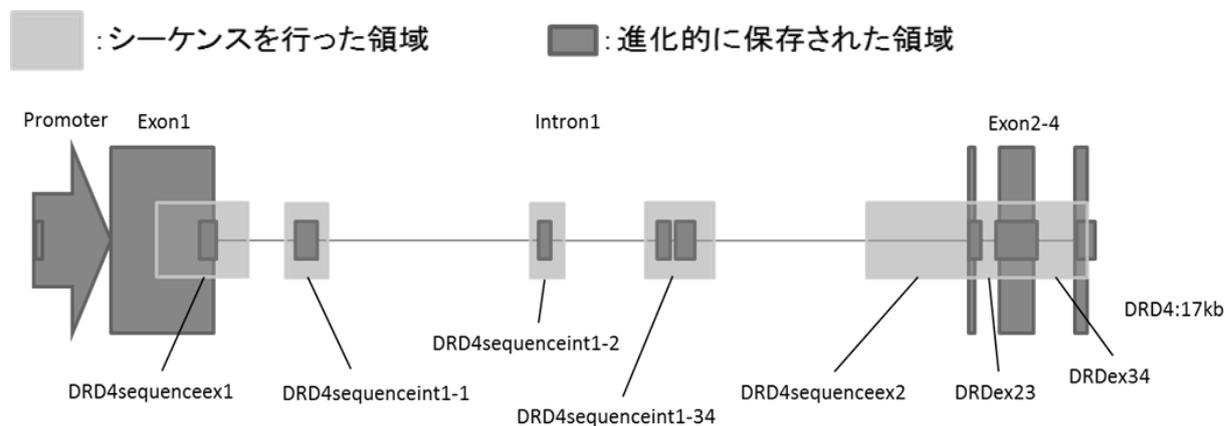
#### (4) DRD4のゲノム構造の解明、多型情報の収集、遺伝的多様性の評価および行動形質や生活史形質との関連に関する研究

トキ死亡個体の脳から抽出されたRNAを用いて、RT-PCRを行った後、ダイレクトシーケンスによりcDNA配列を決定した。DRD4の塩基配列は鳥類では、キジ目に属するニワトリおよびスズメ目に属するシジュウカラでのみ明らかにされている。シブリー・アールキストの鳥類分類によると、トキが属するコウノトリ目とキジ目、あるいはコウノトリ目とスズメ目の類縁関係よりもキジ目とスズメ目の類縁関係のほうが遠縁にある。そこで、ニワトリとシジュウカラの間で相同、つまり保存されている配列はトキでも保存されていると予想される。こうして、PCR増幅には、ニワトリとシジュウカラのDRD4のエクソン領域上で保存されている配列に基づき設計されたプライマーを用いた。また、cDNAの5'末端および3'末端の配列は、本研究で得られたcDNA配列から設計されたプライマーを用いたRACE法により決定した。さらに、当該個体の脳から抽出されたゲノムDNAを用いたPCRおよびダイレクトシーケンスによりイントロン2およびイントロン3の配列を決定した。このようなイントロン領域のPCR増幅には、本研究で得られたcDNA配列とニワトリ・シジュウカラのDRD4ゲノム構造に基づき設計されたプライマーを用いた。

トキDRD4のプロモーター領域およびイントロン1領域の配列を決定するにあたり、ニワトリとシジュウカラの保存配列および、これまでの研究で得られたトキDRD4の部分ゲノム配列より、PCRプライマーを設計し、PCR増幅を行った。その後、PCRプライマー、プライマーウォーキングによって得られたプライマーを利用し、ダイレクトシーケンスにより配列を決定した。

シーケンスによって得られたエクソン領域、転写領域、プロモーター領域およびイントロン領域の解析結果に基づき、GENETYX ver. 10を用いたアライメントを行った。このアライメントにより、DRD4ゲノム配列および全長cDNA配列が決定された。また、このように決定された全長cDNA配列とシジュウカラ、ニワトリDRD4 cDNA配列との相同性解析をGENETYX ver. 10により、またそれらの配列を利用した系統樹解析をCLUSTALおよびPHYLIPにより行った。さらに、GENETYX ver10を用いてニワトリ・トキ・シジュウカラ3種間でのDRD4のプロモーター領域、エクソン領域、イントロン領域の相同性解析を行い、保存配列領域を決定した(図(4)-1)。

佐渡島トキ集団の始祖個体である、友友、洋洋、美美、華陽、溢水の5個体におけるDRD4の塩基配列を調べることとした。トキDRD4の塩基配列において、ニワトリ、シジュウカラ、トキの3種間で保存されているDRD4配列は進化の過程で重要な役割を持っていることが予測される。そこで、本研究ではこの保存配列に基づきシーケンス解析を行っていくこととした。この保存配列領域に基づきGENETYX10を用いてPCRプライマーを設計し、ダイレクトシーケンスにより配列を決定した。シーケンスにより得られた波型配列データを用いて、Sequencher ver5.0による多型検出を行った(図(4)-1)。さらに、始祖5個体のシーケンスによりえられた多型タイピングデータに加えて、後代個体の多型タイピングを行い、それらのデータと家系図を用いることで、始祖5個体が有するDRD4ハプロタイプを解析した。



図(4)-1 保存配列領域およびシーケンス領域

トキDRD4遺伝子多型と行動形質との関連性を調べるために、極端な定性的表現型データを用いた解析を行った。日本産トキ飼育個体の雌において、極端に警戒心が強い6個体と極端に警戒心が弱い9個体を用いた。これらの極端な警戒心形質の表現型を持つ個体は、ほぼ同時期(2004~2006年)に生まれ、個体の選択は佐渡トキ保護センターで収集された行動学的観察データに基づき行われた。これら個体について、DRD4遺伝子のPCR増幅領域のシーケンスにより得られた波形配列データを用いた、SNP3092、SNP13425、indel14077-14085の3ヶ所の多型タイピングを行った。始祖5個体の保有する4種類のハプロタイプのアリルパターンに基づき、得られたシーケンスデータからハプロタイプの決定を行った。極端に警戒心が強い6個体と極端に警戒心が弱い9個体の間において、2群間でのハプロタイプ頻度分布の比較をフィッシャーの直接確率検定とカイ二乗検定により解析することで、警戒心形質とDRD4多型との関連性について検討を行った。

また、トキDRD4遺伝子多型と行動形質との関連性を調べるために、定量的表現型データを用いた解析を行った。日本産トキ放鳥個体の雌において、行動特性である新規開拓性、採餌行動性、分散定着性、生活史形質である生存性についての定量的表現型を決定した。表現型を決定したトキ個体はすべて雌であった。

新規開拓性については、放鳥前の順化ケージでの3ヶ月の訓練期間に、小型のビデオカメラをG池およびA池に複数台設置し、G池およびA池に来訪する個体を調査した。順化ケージ内には、放鳥ゲートから近い順番に、G、A、B1/B2、C、D1/D2、E、F池の9つの池が設置されている。そのうち、A、B1/B2、C池には訓練初期から餌(ドジョウ)を入れ、G池には放鳥直前まで餌を入れないこと

にした。また、訓練中期まで飼育員はC池よりも奥へは立ち入らないようにし、訓練中のトキを放鳥ゲートから遠い順化ケージの奥側で生活させるようにした。こうして、放鳥ゲートに最も近く訓練初期に餌が無いG池、放鳥ゲートに次に近いA池に採餌に訪れる早さ（順化ケージへの搬入からの日数）および利用頻度（確認回数）を調査することにより、新規開拓性の表現型を評価した。

採餌行動性については、放鳥後の個体において、早朝、埒から飛び立つ個体を追跡または生息域を広範囲に探索することで、採餌場所を特定した後、発見した採餌個体について双眼鏡または望遠鏡を用いて採餌行動を観察し、1回の観察につき3分間あたりの飲み込み回数を記録した。この採餌行動の観察は、1日あたり各個体につき最大8回に制限した。放鳥後3-4週目の個体について、採餌回数をカウントし、採餌回数が2.5回以下の個体を低採餌、採餌回数が3.5回以上の個体を高採餌として表現型を評価した。

現在、環境省を中心としたモニタリングにより、放鳥個体の生存確認と生息地・繁殖行動に関する情報が継続的に収集されている。このような情報を基に、各個体の放鳥後1年の生存状況と月ごと（放鳥後1ヶ月は半月ごと）の生息場所が集計されている。そこで、分散定着性については、放鳥地点から定着地点までの距離として、国仲平野東部・中央部に定着した個体を短距離分散、国仲平野西部および佐渡島内外に定着した個体を長距離分散として表現型を評価した。

モニタリング情報に基づき、生存性については、放鳥直後から1年の間での生存の有無により表現型を評価した。

表現型を評価した放鳥個体について、DRD4遺伝子のPCR増幅領域のシーケンスにより得られた波形配列データを用いた、SNP3092、SNP13425、indel114077-14085の3ヶ所の多型タイピングを行った。始祖5個体の保有する4種類のハプロタイプのアリルパターンに基づき、得られたシーケンスデータからハプロタイプの決定を行った。

DRD4ハプロタイプと採餌行動性、分散定着性、生存性との関連性について、表現型が異なる個体群間におけるハプロタイプ頻度の比較により、フィッシャーの直接確率検定とカイ二乗検定を用いて解析を行った。

#### （5）SNPの多型情報の収集および遺伝的多様性の評価に関する研究

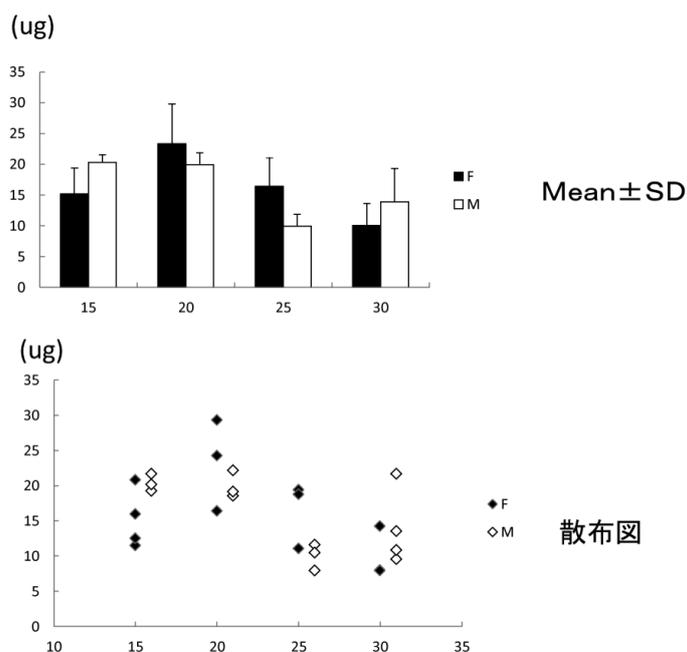
日本トキ集団の始祖5個体からゲノムDNAを精製し、制限酵素*Hae*IIIあるいは*Mbo*Iで完全消化した後、1.5%アガロースゲル電気泳動により分離し、250-350bpのサイズを持つ制限酵素断片をゲルから精製して、Reduced Representation Library (RRL)を作製した。各始祖個体から作製したRRLは異なるタグ配列を持つシーケンス用アダプターを付加した後、混合し、イルミナ社HiSeq2000次世代シーケンサーの1レーンを使用して、各断片の両端101塩基の配列を決定した。得られた101塩基の配列データに対し、データ処理を実施し、一塩基多型(SNP)候補および1マイクロサテライト(STR)候補の検出を実施した。なお、次世代シーケンシングおよび基礎的なデータ処理は北海道システムサイエンス社に委託して行った。

#### 4. 結果及び考察

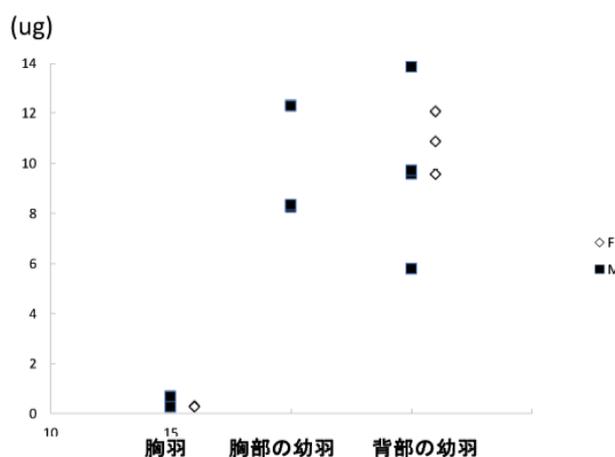
##### (1) 野外サンプルを用いた遺伝子解析手法の確立に関する研究

ふ化後15、20および25日齢でのニワトリヒナの胸部幼羽は棒状羽毛であることが観察され、DNAを抽出できる羽髓をもつことが示唆された。15、20、25日齢時では典型的な棒状羽毛の形状を示しているが、一方、30日齢時では羽が広がっている形状を示しており、棒状羽毛の典型的な形状ではないことも明らかにされた。この結果より、15～25日齢時では有効なDNAサンプリングが行われる可能性が考えられるが、一方、30日齢以降では棒状羽毛ではなくなると考えられ、胸部より羽髓をもつ幼羽が得られにくくなり、高収量のDNAを抽出することが困難になると予想された。図(4)-2より、雄についてのDNA収量は、幼羽1本あたり、15日齢で $20.3 \pm 1.2 \mu\text{g}$ 、20日齢で $19.9 \pm 1.9 \mu\text{g}$ 、25日齢で $9.9 \pm 1.8 \mu\text{g}$ 、30日齢で $13.8 \pm 5.4 \mu\text{g}$ という結果が得られた。雌についてのDNA収量は、15日齢で $15.1 \pm 4.2 \mu\text{g}$ 、20日齢で $23.3 \pm 6.4 \mu\text{g}$ 、25日齢で $16.3 \pm 4.6 \mu\text{g}$ 、30日齢で $10.0 \pm 3.5 \mu\text{g}$ という結果が得られた。よって、雌雄いずれにおいても幼羽1本あたり10～20 $\mu\text{g}$ の高収量なDNAが抽出されることが示された。さらに散布図を見ても同性で同日齢のヒナの個体間にDNA収量についての大きなバラツキは観察されなかった。以上の結果より、ふ化後15、20、25および30日齢でのニワトリヒナの胸部幼羽を実験試料とした場合のDNAの収量に問題がないことが示された。詳細にみると、DNA収量は雌雄ともに20日齢が最も多く、25日齢、30日齢では減少する傾向がみられることから、ニワトリヒナにおいて胸部の幼羽から高収量のDNAを得るのに最も適している日齢は、ふ化後～20日齢であることが推測された。雌雄ともに15、20、25、30日齢の胸部幼羽に由来するDNAのいずれにおいても期待長の明瞭なバンドが検出された。このことから、ニワトリヒナの胸部の幼羽～3本に対して本サンプリング法を適用した場合、1000回以上のPCR反応に利用できる高品質DNAが得られることが示され、DNAの品質に問題がないことが証明された。以上の予備的検討の結果から、本サンプリング法においてニワトリヒナの胸部の幼羽から高収量の高品質DNAが得られることが示された。この結果より、実際にトキヒナにおいても同様の手法により高収量かつ高品質なDNAが得られるのではないかと予測することができた。10～22か月齢でのトキ成鳥の胸羽をみると、明確に筆毛様の棒状羽毛の形状を呈しておらず羽髓をもたないと考えられた。一方、15～21日齢時のトキヒナの胸部の幼羽および15～27日齢時の背部の幼羽では典型的な棒状羽毛の形状を示しており、羽髓をもつと考えられた。よって、ヒナに比べると成鳥では羽髓の量が少なくなってしまう、胸部あるいは背部の幼羽においては十分なDNA収量が得られるが、胸羽からは十分なDNA収量が得られないと予想された。図(4)-3より、胸羽1本あたりのDNA収量をみると雄では $0.4 \pm 0.2 \mu\text{g}$ 、雌では $0.2 \pm 0.0 \mu\text{g}$ という結果が得られた。一方、胸部の幼羽1本あたりのDNA収量をみると雄では $9.6 \pm 2.2 \mu\text{g}$ となり、これまでのニワトリヒナを用いた雌雄での結果より、雌でも同じくらいの収量が得られると考えられた。背部の幼羽1本あたりのDNA収量をみると雄では $9.73 \pm 3.30 \mu\text{g}$ 、雌では $10.7 \pm 1.24 \mu\text{g}$ という結果が得られた。また散布図をみても同性で同齢のトキヒナの個体間にDNA収量についての大きなバラツキは観察されなかった。ここで注目すべき点として、トキヒナの胸部あるいは背部の幼羽はニワトリヒナの幼羽で得られた結果と同様な高収量のDNAが抽出されるが、一方、トキ成鳥の胸羽ではニワトリやトキのヒナの幼羽に比べ、顕著に低いDNA収量しか得られないということが示された。胸羽ならびに胸部および背部の幼羽に由来するDNAのいずれにおいても期待長の明瞭なバンドが検出された。よって、トキヒナの胸部あるいは背部の羽髓をもつ幼羽を～3本用いた場合、本サンプリング法により1000回以上のPCR反応に利用できる高品質DNAが得られることが示さ

れ、本サンプリング法はDNA品質の点でも、野生下で生まれたトキの遺伝的多様性のモニタリングに利用できることが明らかになった。これらの結果を総合的に考え合わせると、ふ化後～20日齢のヒナの2～5本の胸部あるいは背部の羽髄をもつ幼羽を用いてDNA抽出を行うというサンプリング法は1本あたり10 $\mu$ g（1000回以上のPCRに利用可能）という高収量かつ十分なDNA長のPCR増幅が可能な高品質のDNAが得られることから、野生下で生まれたトキの遺伝的多様性のモニタリングに利用できる有効なものであることが明らかにされた。



図(4)-2 ふ化後15、20、25および30日齢でのニワトリヒナの胸部の幼羽（1本）からのDNA収量



図(4)-3 胸羽ならびに胸部および背部の幼羽（1本）からのDNA収量

## (2) マイクロサイトの多型情報の収集および遺伝的多様性の評価に関する研究

後代188個体からなる全集団について解析を行ったところ(表(4)-1)、Aは始祖5個体にも関わらず全集団の最大値は3であった。また、始祖5個体と後代188個体からなる全集団におけるAは同値(始祖個体におけるすべてのマーカーの平均:2.16、全集団におけるすべてのマーカーの平均:2.16)を示し、始祖個体で検出されるアレルのすべてが後代に伝達されていることが判明した。全集団における $n_e$ 、 $H_e$ 、 $H_o$ およびPICの平均はそれぞれ1.704、0.367、0.471および0.302であった。 $n_e$ 、 $H_e$ 、 $H_o$ およびPICは3つのアレルを持つNn01、Nn12およびPM221で高い値を示した。一方、Nn17およびPM237ではそれぞれ2007年に導入された華陽および溢水が持つ1コピーの希少アレルのため $n_e$ 、 $H_e$ 、 $H_o$ およびPICは低い値を示した。A、 $n_e$ 、 $H_e$ 、 $H_o$ およびPICはbottle neckを受けた動物と同様なレベルの低値を示したことから遺伝的多様性は低いと考えられた。ハーディー・ワインベルグ平衡の検定にて5%水準で有意を示した平均を含めた7個のケースのうち6個で $H_e$ より $H_o$ が高い値を示した。つまりheterozygote excessの状態であることが観察された。残りの1個のケースであるPM2-20はクロツラヘラサギにおいてZ染色体上にのみ存在し、W染色体上に存在しないことが報告されている。実際に、トキにおいても雌では必ずホモ接合体であるとタイピングされた。

表(4)-1 後代188個体からなる全集団における遺伝的多様性に関するパラメーター

マーカー名	始祖個体						後代全集団									
	遺伝子型					A	n	アレル頻度			A	$n_e$	$H_e$	$H_o$	PIC	HWE
	友友	洋洋	美美	華陽	溢水			1	2	3						
Nn01	12	12	13	12	11	3	186	0.664	0.231	0.105	3	1.979	0.496	0.532	0.437	※
Nn04	22	12	12	12	12	2	168	0.452	0.548	0.000	2	1.982	0.497	0.512	0.373	
Nn12	23	13	23	12	13	3	172	0.297	0.328	0.375	3	2.972	0.666	0.802	0.590	※
Nn17	22	22	22	22	12	2	187	0.011	0.989	0.000	2	1.022	0.021	0.021	0.021	
Nn18	12	22	12	22	12	2	180	0.169	0.831	0.000	2	1.392	0.282	0.283	0.242	
Nn21	11	12	12	22	12	2	163	0.525	0.475	0.000	2	1.995	0.500	0.571	0.374	
Nn25	12	12	22	22	12	2	176	0.378	0.622	0.000	2	1.887	0.472	0.506	0.360	
Nn26	12	11	12	12	12	2	184	0.682	0.318	0.000	2	1.766	0.435	0.516	0.340	※
NnNF5	22	12	12	22	12	2	187	0.233	0.767	0.000	2	1.555	0.358	0.465	0.293	※(※)
PM117	12	11	12	12	12	2	175	0.703	0.297	0.000	2	1.717	0.419	0.446	0.331	
PM216	12	11	11	22	22	2	160	0.800	0.200	0.000	2	1.471	0.321	0.325	0.269	
PM220	12	11	11	12	11	2	162	0.830	0.170	0.000	2	1.393	0.283	0.191	0.242	※(※)
PM221	12	13	11	12	13	3	165	0.476	0.185	0.339	3	2.662	0.626	0.636	0.549	※(※)
PM228	12	11	12	12	12	2	179	0.757	0.243	0.000	2	1.582	0.369	0.374	0.300	
PM229	22	12	12	22	22	2	144	0.406	0.594	0.000	2	1.932	0.484	0.549	0.366	
PM237	22	22	22	12	22	2	184	0.008	0.992	0.000	2	1.017	0.016	0.016	0.016	
PM313	22	12	22	22	22	2	188	0.114	0.886	0.000	2	1.254	0.203	0.228	0.182	
Aau02	12	22	12	22	12	2	184	0.255	0.745	0.000	2	1.614	0.381	0.402	0.308	
Wsu13	11	11	12	12	11	2	117	0.919	0.081	0.000	2	1.175	0.15	0.162	0.138	
平均						2.16					2.16	1.704	0.367	0.471	0.302	※(※)

A: アレル多様度、 $n_e$ : 有効アレル数、 $H_e$ : ヘテロ接合率の期待値、 $H_o$ : ヘテロ接合率の観察値、PIC: 多型情報量、HWE: ハーディー・ワインベルグ平衡検定、始祖個体の遺伝子型における数値(1、2あるいは3)はアレルを示す。HWEにて5%水準で有意なものは※、Bonferroni補正後でも有意なものは※(※)で示す

こうしてこのマーカーでheterozygote deficiencyが確認されたが、この点については、このマーカーがトキにおいてもZ染色体上にのみ存在し、雌では必ずヘミ接合体になってしまうことに起因すると考えられた。平均を含めた6個のケースで $H_o$ が $H_e$ より高くなったことから佐渡島トキ集団はbottle neckを受けた集団であるかもしれない。一方、始祖5個体のアレルがすべて後代個体に伝達していること、平均を含めた6個のケースでheterozygote excessの状態を示したということは遺伝的多様性を維持していくための計画交配がうまくいっていることを反映していると考えられた。次に現存個体を飼育下集団、放鳥下集団に分け同様の解析を行った。123個体からなる飼育下集団におけるAは、始祖5個体のAと同値を示し、始祖個体で検出されるアレルのすべてが後代に伝

達されていることが判明した。また、飼育下集団は全集団と似たような傾向の遺伝的多様性に関するパラメーターの値を示した。放鳥下集団は、始祖5個体のAよりも低値を示した(始祖個体におけるすべてのマーカーでの平均:2.16、放鳥下集団におけるすべてのマーカーでの平均:2.05)。これはNn17、PM2-37のマーカーにおいて始祖個体のAはそれぞれ2であるのに対し、放鳥下集団ではそれぞれ1となっていることに起因していた。つまり、2007年に導入された華陽、溢水が保有していた1コピーのアリルが伝達されていないことを示している。また、Nn17およびPM2-37のマーカーを除く17個のマーカーについてハーディー・ワインベルグ平衡の検定を行ったところ放鳥下集団ではNn01、NnNF5、PM2-20ならびにすべてのマーカーでの平均が5%水準有意であり、そのうちすべてのマーカーでの平均はBonferroni補正後でも有意であった。しかし、heterozygote excessの状態にあるのはすべてのマーカーでの平均を含め3ケースだけであり、全集団や飼育下集団と比較してもケースは少なかった。これらのことから、遺伝的多様性を維持するための放鳥個体の選定が今後必要であると考えられた。トキ由来の17個のマーカー(本研究で用いたNn01、Nn04、Nn12、Nn17、Nn18、Nn21、Nn25、Nn26およびNnNF5マーカーに加えてNn03、NnAF4、NnBF7、NnCE11、NnCG3、NnDD9、NnEB12およびNnHB12マーカーを用いた)に関しては、文献情報から中国トキ集団における遺伝的多様性に関するパラメーターが得られ、42個の対立遺伝子が検出されている。そこで、解析した佐渡島トキ集団と中国トキ集団の間で遺伝的多様性に関するパラメーター値の比較を行った(表(4)-2)。

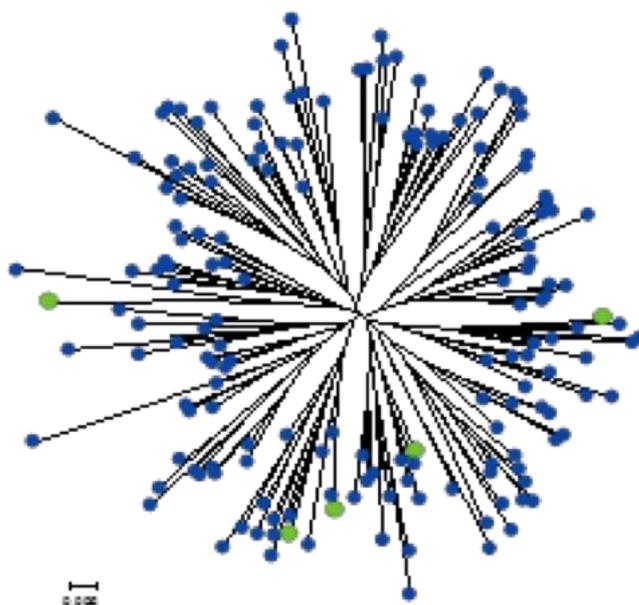
表(4)-2 佐渡島トキ集団と中国トキ集団の遺伝的多様性に関するパラメーターの比較

マーカー名	佐渡集団				中国集団			
	A	Ne	He	Ho	A	Ne	He	Ho
Nn01	3	1.979	0.496	0.532	5	3.356	0.702	0.704
Nn03	1	1.000	0.000	0.000	2	1.443	0.307	0.222
Nn04	2	1.982	0.497	0.512	2	1.692	0.409	0.333
Nn12	3	2.972	0.666	0.802	3	3.012	0.666	0.370
Nn17	2	1.022	0.021	0.021	2	1.905	0.475	0.444
Nn18	2	1.392	0.282	0.283	2	2.028	0.507	0.778
Nn21	2	1.995	0.500	0.571	2	1.938	0.484	0.630
Nn25	2	1.887	0.472	0.506	4	3.333	0.700	0.926
Nn26	2	1.766	0.435	0.516	2	1.299	0.230	0.259
NnAF4	1	1.000	0.000	0.000	2	1.010	0.010	0.010
NnBF7	1	1.000	0.000	0.000	3	1.019	0.019	0.019
NnCE11	1	1.000	0.000	0.000	2	2.008	0.502	0.990
NnCG3	1	1.000	0.000	0.000	2	1.019	0.019	0.000
NnDD9	1	1.000	0.000	0.000	2	1.019	0.019	0.000
NnEB12	1	1.000	0.000	0.000	2	1.010	0.010	0.010
NnHB12	1	1.000	0.000	0.000	2	1.019	0.019	0.000
NnNF5	2	1.555	0.358	0.465	3	1.590	0.371	0.463
平均	1.647	1.444	0.219	0.248	2.471	1.747	0.321	0.362

A: アリル多様度、ne: 有効アリル数、He: ヘテロ接合率の期待値、Ho: ヘテロ接合率の観察値

佐渡島トキ集団では8個のマーカーで単型であり、合計で28個のみの対立遺伝子が見つかった。佐渡島集団では平均のAは中国集団と比べて低くなっていた。平均のne、HE、Hoはそれぞれ中国集団と比較して、佐渡島集団で低い値を示した。Nn04、Nn21、Nn26の3ケースでのみne、HE、Hoは中国集団と比べて佐渡島集団で高い値を示したが、それ以外のたいていのケースにおいて低い値を示した。この結果から佐渡島トキ集団において遺伝的多様性のレベルは低く、ボトルネックより生じた結果と考えられた。トキDNAにおいてPCR増幅が確認された66個のマーカー(本研究でもちいた19個のマーカーに加えてNn03、NnAF4、NnBF7、NnCG3、NnLF11、NnDD9、NnEB12、NnHB10、NnEA9、NnAD10、NnEH10、NnGF4、Wsu03、Wsu09、Wsu17、Wsu19、Wsu23、Wsu24、Eru02、Eru03、Eru04、

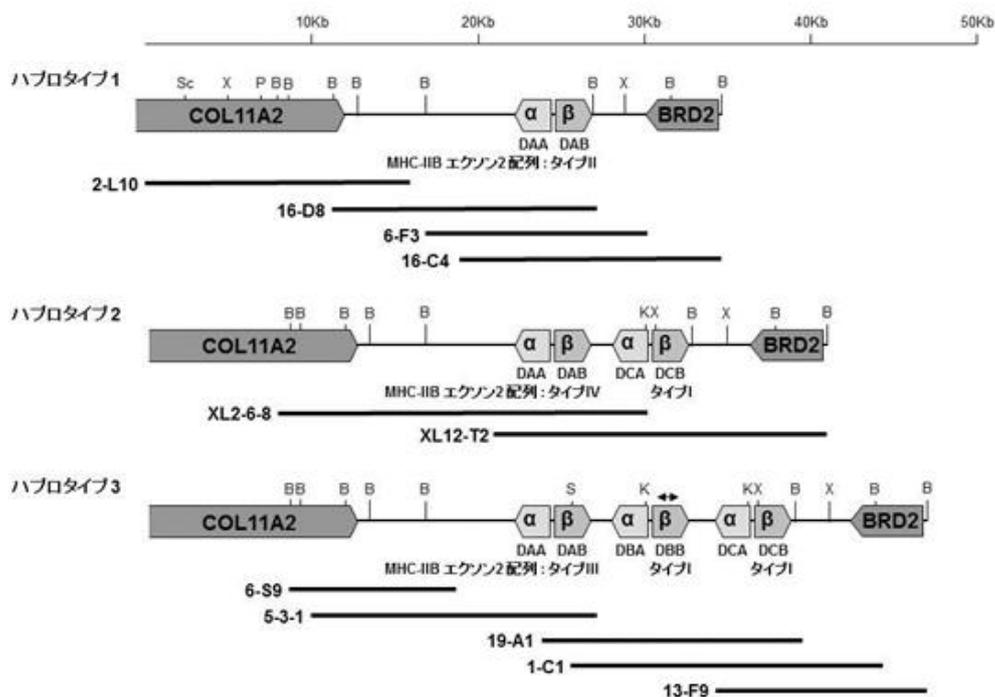
Eru05、Eru06、Eru07、Eru08、Eru09、Eru10、Eru11、PM1-4、PM1-13、PM2-68、PM3-15、PM3-16、PM3-17、PM3-20、PM3-22、PM3-25、PM3-28、PM3-29、PM3-31、Aaju01、Aaju03、Aaju04、Aaju05、Aaju06、NnCE11、Wsu14)のタイピングデータから、MICROSATELLITE ANALYZER version 4.05により始祖5個体に加えて、後代188個体からなる全集団および65個体からなる放鳥下集団におけるDpsを計算した。このDpsに基づき、PHYLIPを用いて、全集団における樹形図解析を行った(図(4)-4)。全集団では、全体的にほとんど放射状に分布し、始祖5個体のいずれにも偏ることなく分布していた。こうして、始祖5個体を持つゲノムが集団レベルで等しく後代個体に伝わっており、個体レベルでは様々な混合パターンで後代個体に伝達していると示唆された。つまり計画交配がうまく働いていると考えられた。



図(4)-4 PHYLIPにより作成した樹形図における全集団の個体のプロット図  
(始祖5個体(緑)および全体集団)

### (3) MHC領域のゲノム構造の解明、多型情報の収集および遺伝的多様性の評価に関する研究

トキMHC領域の多様性に関するこれまでの研究により、トキMHC-IIB遺伝子のエクソン2について4種類の配列(タイプI-IV)が存在することが示されている。しかし、そのゲノム構造が明らかになっていないために正確な多様性の評価は困難であった。そこでトキMHCクラスII領域のゲノム構造を明らかにするために、死亡したメス個体および始祖個体Eからゲノムライブラリーを作製し、トキMHCクラスII領域のクローニングを実施した。その結果、3種類のコンティグが作製された(図(4)-5)。一つ目のコンティグ(ハプロタイプ1:HP1)は約35kbのサイズで、11型コラーゲン $\alpha$ 2鎖遺伝子(COL11A2)の一部と、1コピーのMHC-IIA/IIBペア(DAA\*01/DAB\*01アレル)、さらにBRD2遺伝子を含んでいた。MHC-IIB遺伝子(DAB\*01アレル)のエクソン2配列はタイプIIであった。二つ目のコンティグ(ハプロタイプ2:HP2)は約35kbのサイズで、COL11A2遺伝子の一部と、2コピーの



図(4)-5 トキMHCクラスII領域のゲノム構造の模式図

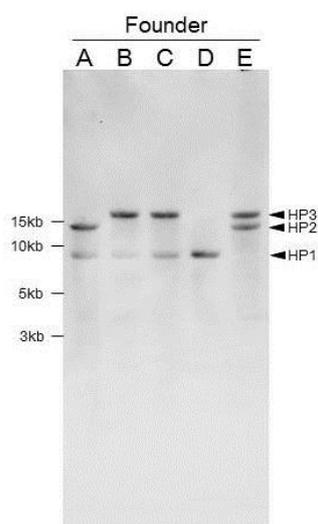
異なるハプロタイプを表す3種類のコンティグが作製された。11型コラーゲン $\alpha$ 2鎖 (*COL11A2*), MHC-IIA ( $\alpha$ ), MHC-IIB ( $\beta$ )および *bromodomain-containing 2* (*BRD2*) 遺伝子とこれらの方向が示された。遺伝子座名は MHC-IIAと-IIB 遺伝子の下段に記述した。B, K, P, S, Sc およびX はサブクローニングに使用した制限酵素 *Bam*HI, *Kpn*I, *Pst*I, *Sal*I, *Sac*I, および *Xho*Iを表している。地図の下の大線はクローニングしたラムダファージクローンの位置を示している。MHC-IIB遺伝子の下に、エクソン2の配列タイプを記述した。

MHC-IIA/IIBペア (DAA\*02/DAB\*02、およびDCA\*02/DCB\*02アレル)、さらにBRD2遺伝子を含んでいた。DAB\*02およびDCB\*02アレルのエクソン2配列は、それぞれタイプIVおよびIであった。三つ目のコンティグ(ハプロタイプ3:HP3)は約40kbのサイズで、COL11A2遺伝子の一部と、3コピーのMHC-IIA/IIBペア (DAA\*03/DAB\*03、DBA\*03/DBB\*03およびDCA\*03/DCB\*03アレル)、さらにBRD2遺伝子を含んでいた。DAB\*03、DBB\*03およびDCB\*03アレルのエクソン2配列は、それぞれタイプIII、IおよびIであった。

MHC-IIAと-IIB遺伝子を詳細に解析するために、これらの遺伝子を含むHP1、HP2およびHP3それぞれの約8、13、18Kbの *Bam*HI断片の全塩基配列を決定した。決定した塩基配列および3種類のハプロタイプの制限酵素地図に基づいて、サザンブロット法並びにPCR-RFLP法により、日本トキ集団の始祖5個体でのMHCクラスII領域の遺伝的多様性を解析した。サザンブロット解析では、HP1、HP2およびHP3に対応する8、13および18kbのバンドが検出された(図(4)-6)。PCR-RFLP法では、*Rsa*Iで切断されないバンドがHP1を持つことを、*Pst*Iで切断されたバンドがHP2を持つことを、*Sal*Iで切断されたバンドがHP3を持つことを示した(図(4)-7)。これらの結果から、始祖5個体A、B、C、DおよびEのMHCクラスII領域の遺伝子型はそれぞれHP1/2、HP1/3、HP1/3、HP1/1およびHP2/3であると

推定された。さらに、サザンブロット解析において、3種類のハプロタイプに対応するバンド以外にシグナルは検出されておらず、MHCクラスII領域がトキゲノムに1座位であることを示唆した。結論として、始祖集団内にはMHCクラスII領域のパプロタイプは3種類のみであり、極めてその多様性が低いことが示された。また、本研究で開発したPCR-RFLP法は、後代集団に対してもMHCクラスII領域の遺伝子型判定が可能であると考えられた。

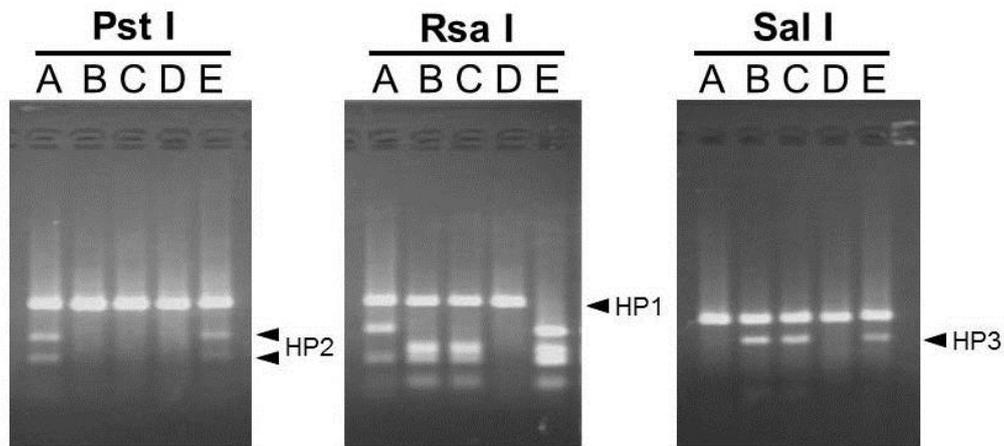
コウノトリのMHC領域のゲノム構造の解析では、クローニングの結果、約160kbのコンティグが作製された(図(4)-8)。各陽性クローンの一部の塩基配列を決定しホモロジー検索を実施した結果、コウノトリMHC領域のおおよそのゲノム構造(COL11A2-2コピーのMHC IIA/IIBペア-BRD2-DMA-DMB1-DMB2-MHC I-TAP1-TAP2-2コピーのMHC I-TNXB)が決定された。現在、全塩基配列の決定を進めており、その完了後にさらに配列データの解析を進めることで詳細なゲノム構造が明らかになると期待される。始祖6個体のゲノムDNAからPCR法によりDAB1~BRD2までの領域を増幅し、2つのMHC-IIB遺伝子(DAB1とDAB2)のエクソン2配列を決定することで、各個体の持つMHCクラスII領域のハプロタイプを解析した。PCR産物の鎖長から始祖個体DとEは、MHC-IIA/IIB遺伝子ペアが2組のハプロタイプに加え、ペアが1組のハプロタイプを持つことが示された。エクソン2配列の比較からは、DAB1については8種類の、DAB2については6種類のアレルが存在することが明らかになり、両者を合わせたハプロタイプとして9種類が検出された(図(4)-9)。前述のとおり、日本トキ集団の始祖5個体が有するMHCクラスIIハプロタイプは3種類のみである。今回の結果から、日本トキ集団と比較して、日本コウノトリ集団のMHC領域の遺伝的多様性は高いことが示された。



図(4)-6 サザンブロット法によるMHCクラスII領域の検出

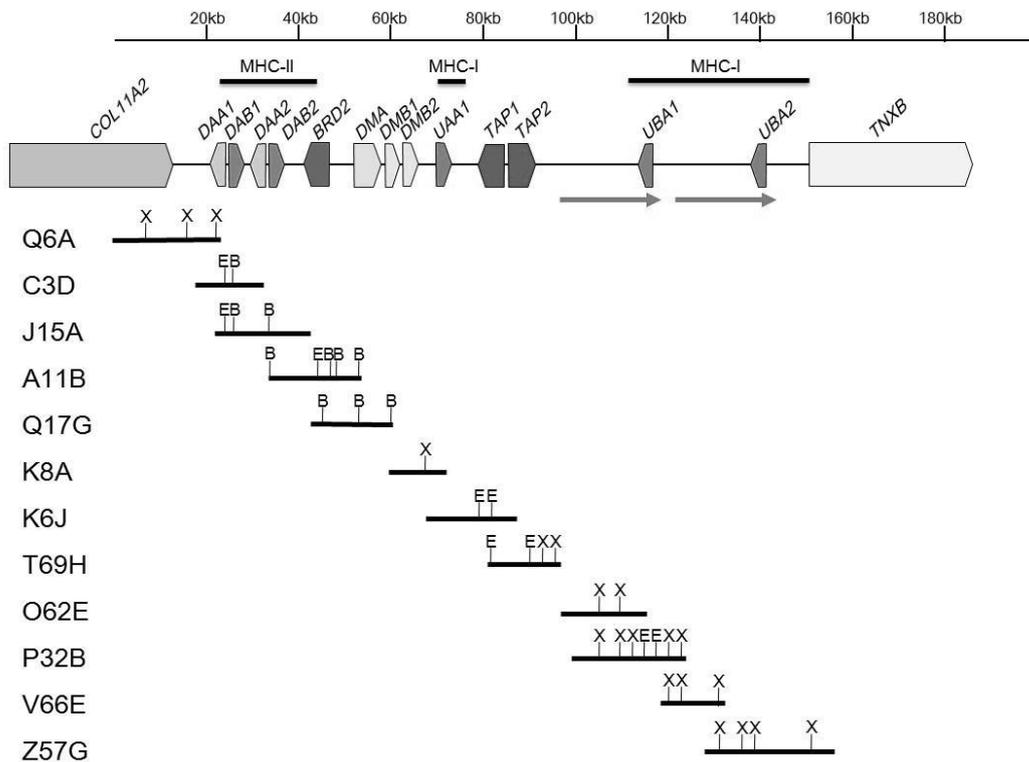
始祖5個体(A-E)からのゲノムDNAは制限酵素 *Bam*HI と *Eco*RI で切断され、MHC-IIAエクソン3、MHC-IIBエクソン2とMHC-IIBエクソン3の3種類を混合したプローブでハイブリダイゼーションを行った。

HP1、HP2およびHP3に対応する8、13および18kbのバンドが検出された。



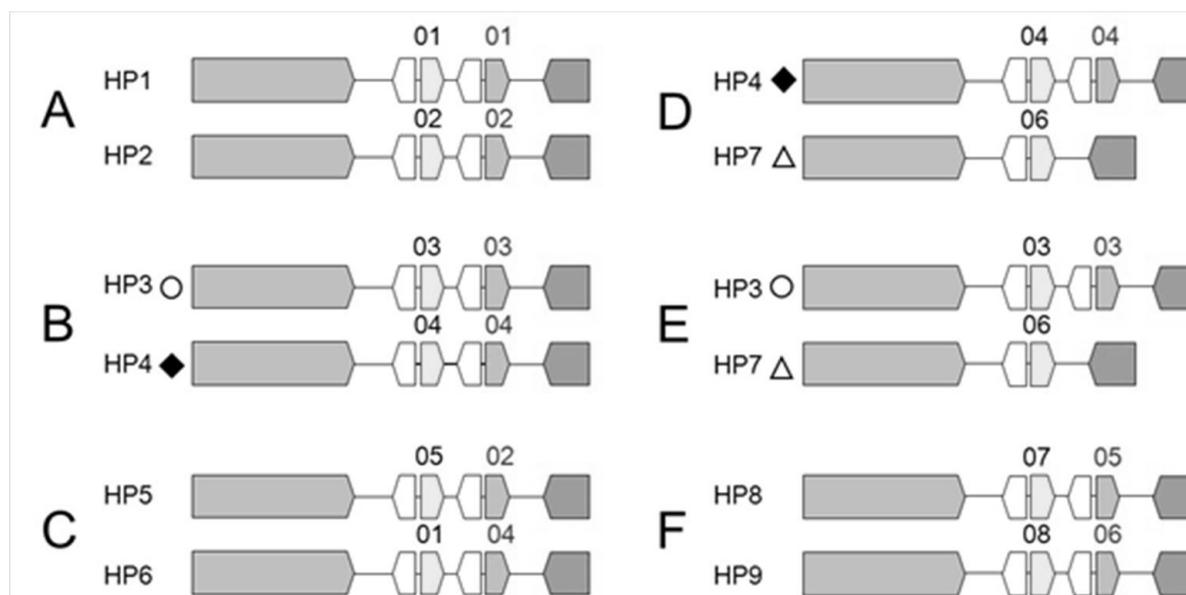
図(4)-7 PCR-RFLP法によるMHCクラスII領域の多型の解析

始祖5個体(A-E)からのゲノムDNA から279bpのMHC-II遺伝子エクソン2を増幅し、PCR産物を制限酵素 *Pst*I、*Rsa*Iあるいは*Sal*Iで切断した後、3%アガロースゲルで解析した。*Rsa*Iで切断されないバンドはHP1を、*Pst*Iで切断されるバンドはHP2を、*Sal*Iで切断されるバンドはHP3を持つことを表している。



図(4)-8 コウノトリMHC領域のゲノム構造および単離された陽性クローン

クローニングの結果、約160kbのコンティグが作製され、一部の塩基配列より推定されたゲノム構造を示している。左から順にCOL11A2、DAA1、DAB1、DAA2、DAA2、BRD2、DMA、DMB1、DMB2、UAA1、TAP1、TAP2、UBA1、UBA2、TNXB遺伝子およびその転写方向を表している。単離した陽性クローンを黒線で示している。B、E および X はサブクローニングに使用した制限酵素 *Bam*HI、*Eco*RI および *Xho*Iを表している。



図(4)-9 始祖6個体におけるMHCクラスII領域の多様性

始祖個体A～Fの各染色体におけるMHCクラスII領域のゲノム構造を模式的に示している。灰色の遺伝子はCOL11A2、緑色の遺伝子はBRD2を表しており、MHC-IIB上の数字は、そのハプロタイプにおけるDAB1エクソン2アレル番号(黒色)およびDAB2エクソン2アレル番号を示す。それらの組み合わせに基づくハプロタイプ番号を左に示し、同じハプロタイプには共通の記号(HP3: ○、HP4: ◆、HP7: △)を併記している。

#### (4) DRD4のゲノム構造の解明、多型情報の収集、遺伝的多様性の評価および行動形質や生活史形質との関連に関する研究

トキにおける1,155 bpの全コード領域を含むDRD4 cDNA配列を決定した。また、ニワトリで多型が報告されているエクソン1領域上のプロリンリピート数が4であること、シジュウカラの新規探索性の形質と相関がみられることが報告されているSNP830に相当する塩基では、Tアレルであることを明らかにした。また、ヒトの精神病と関連がみられるエクソン1上ミニサテライトの相当配列は同定されたものの、ヒト・イヌ・ウマでみられるエクソン3上ミニサテライトの相当配列は検出されなかった。また、トキDRD4の5'フランキンク領域の1228bpの配列、およびイントロン1領域の12118bpの配列を決定した。

最終的に、DRD4遺伝子のゲノム構造決定の結果をまとめると、5'フランキンク領域の1228bp、エクソン1領域の1652bp、イントロン1領域の12118bp、エクソン2領域の113bp、イントロン2領域の365bp、エクソン3領域の548bp、イントロン3領域の734bpおよびエクソン4領域の278bpが決定され、タンパクをコードする領域は1155bpで、385個のアミノ酸をコードすることがわかった。

決定したトキのcDNA配列について、GENETYX ver. 10を用いてニワトリおよびシジュウカラのDRD4 cDNA配列との相同性解析を行ったところ、トキ・ニワトリ間では89.2%、トキ・シジュウカラ間では87.6%、ニワトリ・シジュウカラ間では86.6%の相同性を示した。さらに、cDNA配列に基づき遺伝距離を算出し、系統樹解析を行ったところ、3種のDRD4の間ではニワトリとシジュウカラが一番相同性が低く、トキとニワトリが一番相同性が高いという相同性解析と同様の結果を示した。

また、アミノ酸配列における相同性解析においては、類似性ではトキ・ニワトリ間では98.7%、トキ・シジュウカラ間では97.5%、ニワトリ・シジュウカラ間では97.0%の相同性を示し、cDNAレベルでの解析と同様の結果となったが、同一性ではトキ・ニワトリ間では89.4%、トキ・シジュウカラ間では90.4%、ニワトリ・シジュウカラ間では86.5%の相同性を示し、これまでの系統学的研究での結果と同様の結果となった。

ニワトリDRD4では、エクソン1、エクソン2、エクソン3およびエクソン4領域はそれぞれ846bp、112bp、553bpおよび2127bpであり、イントロン1、イントロン2およびイントロン3領域はそれぞれ4120bp、126bpおよび369bpであることが明らかにされている。トキDRD4と比較すると、エクソン1、イントロン1、イントロン2およびイントロン3領域はトキDRD4のほうが長い、エクソン4領域はニワトリDRD4のほうが長かった。また、エクソン2およびエクソン3領域はほぼ同じ長さであることが明らかになった。

シジュウカラDRD4については、エクソン1、エクソン2、エクソン3およびエクソン4領域はそれぞれ313bp、112bp、550bpおよび255bpであり、イントロン1、イントロン2およびイントロン3領域はそれぞれ7161bp、335bpおよび408bpであることが明らかにされている。トキDRD4と比較すると、エクソン1、イントロン1およびイントロン3領域はトキDRD4のほうが長く、エクソン2、エクソン3、エクソン4およびイントロン2領域はほぼ同じ長さであることが明らかになった。

さらに、決定したトキDRD4の配列と、ニワトリ、シジュウカラのDRD4の配列を用いて保存配列領域を決定するために3種間で相同性解析を行った。

プロモーター・エクソン1領域の相同性解析の結果、トキ・ニワトリ間のプロモーター領域では1か所、エクソン1領域では2か所、トキ・シジュウカラ間のプロモーター領域では2か所、エクソン1領域では1か所、ニワトリ・シジュウカラ間のプロモーター領域では1か所、エクソン1領域では1か所が相同していた。

エクソン2～エクソン4領域の相同性解析の結果、トキ・ニワトリ間では3か所、トキ・シジュウカラ間では2か所、ニワトリ・シジュウカラ間では3か所が相同していた。

イントロン1領域の相同性解析の結果、トキ・ニワトリ間では5か所と低い程度の相同性を示す3か所、トキ・シジュウカラ間では10か所、ニワトリ・シジュウカラ間では4か所と低い程度の相同性を示す1か所が相同していた。

以上の結果をまとめると、トキDRD4ゲノム上では、転写開始点の上流1207bpから1087bpまでのプロモーター領域上の配列、転写開始点の下流1426bpのエクソン1上からエクソン1の下流33bpのイントロン1配列までの配列、エクソン1の下流1393bpから1744bpまでのイントロン1配列、エクソン1の下流5221bpから5419bpまでのイントロン1配列、エクソン1の下流7314bpから7520bpまでのイントロン1配列、エクソン1の下流7615bpから7910bpまでのイントロン1配列、エクソン2の上流29bpのイントロン1配列からエクソン2の下流66bpのイントロン2配列までの配列、エクソン3の上流70bpのイントロン2配列からエクソン3の下流49bpイントロン3配列までの配列およびエクソン4の上流68bpのイントロン3配列からエクソン4全領域を含む配列が3種間で相同性があることが明らかになった（図(4)-1）。これらの配列は3種間で保存されており、この保存配列には機能的に重要な配列が含まれている可能性があると考えられた。

始祖5個体のシーケンスの結果、5個体間で差がみられた塩基配列の部分の遺伝子型を以下の表(4)-3に示した。なお、トキDRD4遺伝子上の特定の位置を指定して論じる場合に便宜を図るため、

エクソン1の転写開始点を1とした。以下、そのような塩基配列上の特定の位置を指定する配列番号を用いることとした。

表(4)-3 始祖5個体のシーケンス結果

データベース 上の塩基配列	T	GGAGCC 反復数 4	T	T	C	G	C	C	CCT 反復数 3
友友 (Youyou)	G/T	3/4	C/T	C/T	A/C	C/G	C/T	C/T	3/3
洋洋 (Yanyan)	T/T	3/4	T/T	T/T	C/C	C/G	C/T	C/T	3/3
美美 (Meimei)	G/T	3/3	C/T	C/T	A/C	C/C	T/T	T/T	2/3
華陽 (Hooyan)	T/T	3/3	T/T	T/T	C/C	C/C	T/T	T/T	2/3
溢水 (Iayun)	G/T	3/3	C/T	C/T	A/C	C/C	T/T	T/T	3/3
配列番号	1030	1232-1255	1458	1504	3092	13425	13427	13453	14077- 14085
多型	SNP1030	Indel1232- 1255	SNP1458	SNP1504	SNP3092	SNP13425	SNP13427	SNP13453	indel14077- 14085
	[1]	[1]	[1]	[1]	[2]	[3]	[3]	[3]	[4]

表(4)-3に示されるように、7箇所においてSNPがみられ、2箇所においてindel多型がみられたため、全部で9箇所において多型が検出された。配列番号1030のSNPでは、GとTのアリルが存在した。配列番号1232-1255のindel多型では、GGAGCCのコア配列の反復数が3回のアリルと4回のアリルが存在した。配列番号1458のSNPでは、CとTのアリルが存在した。配列番号1504のSNPでは、CとTのアリルが存在した。配列番号3092のSNPでは、AとCのアリルが存在した。配列番号13425のSNPでは、CとGのアリルが存在した。配列番号13427のSNPでは、CとTのアリルが存在した。配列番号13453のSNPでは、CとTのアリルが存在した。配列番号14077-14085のindel多型では、CCTのコア配列の反復数が2回のアリルと3回のアリルが存在した。多型名の下に示された数字は多型検出のための各PCR領域（[1]:DRD4sequenceex1、[2]:DRD4sequenceint1-1、[3]:DRD4sequenceex2、[4]:DRDex23）に対応している。DRD4上の各多型の位置を以下の図(4)-10に示した。



図(4)-10 DRD4上の各多型の位置

配列番号1030のSNPと配列番号1232-1255のindel多型はエクソン1の非翻訳領域に存在していた。配列番号1458と配列番号1504のSNPはエクソン1の翻訳領域に存在し、同義置換であり、前者はアラニン、後者はロイシンのアミノ酸に対応するものであった。配列番号3092、配列番号13425、配

列番号13427および配列番号13453のSNPはイントロン1の領域に存在していた。配列番号14077-14085のindel多型はイントロン2の領域に存在していた。

配列番号1232-1255のindel多型は、蛋白質コード領域に近い上流の位置に存在しており、mRNAから蛋白質へ転写する際の発現調節に関わっている可能性があると考えられた。トキ以外の哺乳類や鳥類においてDRD4遺伝子の繰り返し配列の変異・多型と気質行動形質の変化には関連があることが報告されていることから、この繰り返し配列の多型も同様に、気質行動形質と関連がある可能性があると考えられた。また、配列番号1458と配列番号1504のSNPは蛋白質コード領域に存在している同義置換であり、直接蛋白質中に変異は起こさずとも、mRNAの安定性の変化により、発現量の変化を引き起こしている可能性があると考えられた。その他の変異についても、発現調節に関わることにより、気質行動形質への変化につながる可能性があると考えられた。

それぞれの多型において、配列番号1030のSNPをSNP1030、配列番号1232-1255のindel多型をindel1232-1255、配列番号1458のSNPをSNP1458、配列番号1504のSNPをSNP1504、配列番号3092のSNPをSNP3092、配列番号13425のSNPをSNP13425、配列番号13427のSNPをSNP13427、配列番号13453のSNPをSNP13453、配列番号14077-14085のindel多型をindel14077-14085と命名した。さらに、DRD4遺伝子のハプロタイプを解析したところ、始祖5個体は4種類のDRD4ハプロタイプを有しており、始祖5個体において、ハプロタイプⅠ、Ⅳはそれぞれ始祖の3個体で一つずつ保有されており、ハプロタイプⅡ、Ⅲはそれぞれ始祖の2個体で一つずつ保有されていた（図(4)-11）。

友友	Ⅲ - T4TTCGCC3	Ⅳ - G3CCACTT3
洋洋	Ⅰ - T3TTCCTT3	Ⅲ - T4TTCGCC3
美美	Ⅱ - T3TTCCTT2	Ⅳ - G3CCACTT3
華陽	Ⅰ - T3TTCCTT3	Ⅱ - T3TTCCTT2
溢水	Ⅰ - T3TTCCTT3	Ⅳ - G3CCACTT3

図(4)-11 始祖5個体におけるDRD4ハプロタイプの決定

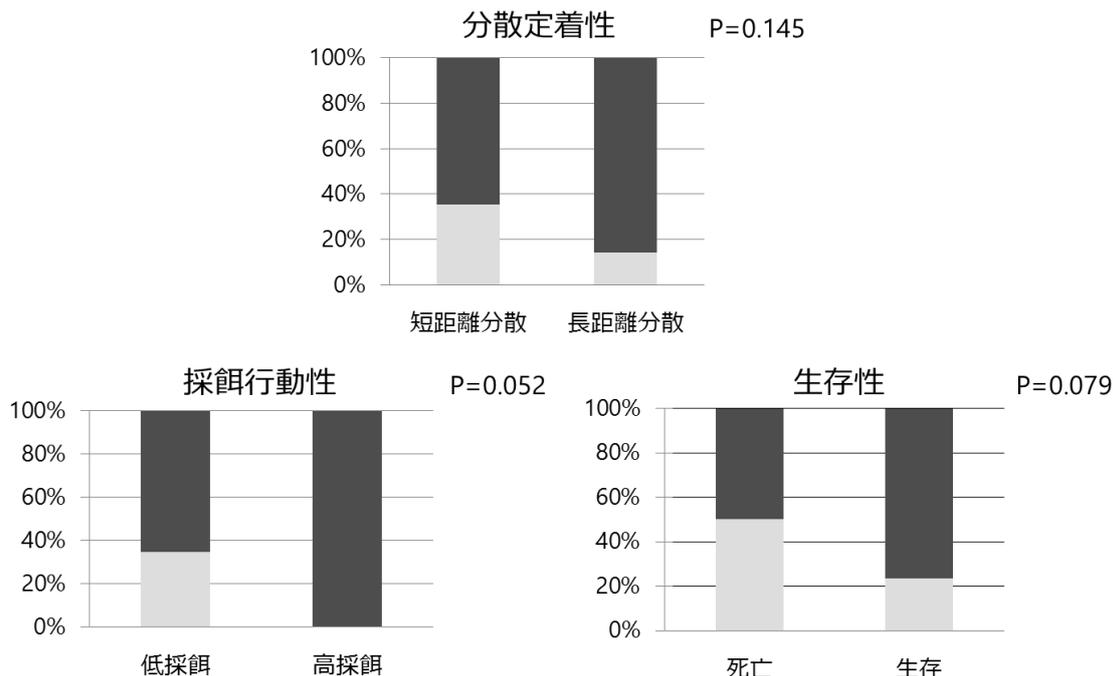
これまでの研究で得られた日本産トキ集団が保有しているDRD4の4種類のハプロタイプのアリルパターンをみると、9個のすべての多型がハプロタイプ特異性を持つことが明らかにされた。こうして、関連性の解析には、4種類のハプロタイプのそれぞれのコピー数を用いることにした。さらに、SNP3092、SNP13425、indel14077-14085の3つの多型をタイピングすることにより、ハプロタイプが決定できることも明らかにされた（表(4)-4）。

表(4)-4 DRD4ハプロタイプにおけるアリルパターン

		多型								
		-330	-128	+99	+145	+1733	+12066	+12068	+12094	+12717
I	T	3	T	T	C	C	T	T	3	
II	T	3	T	T	C	C	T	T	2	
III	T	4	T	T	C	G	C	C	3	
IV	G	3	C	C	A	C	T	T	3	

最初に、極端な定性的表現型データを用いた解析を行った。極端な警戒心が弱い個体群と極端に警戒心が強い個体群の間でのハプロタイプ頻度分布の差を検定した。DRD4の4種類の各ハプロタイプのコピー数との相関解析を行った結果、警戒心形質と各ハプロタイプのコピー数との有意な相関はみられなかった。

次に、定量的表現型データを用いた解析を行った。日本産トキ放鳥集団において、行動特性である新規開拓性、採餌行動性、分散定着性と生活史形質である生存性について定量的表現型データを評価した。



図(4)-12 DRD4ハプロタイプと行動特性、生活史形質との関連

サブテーマ1から得られた定量的表現型データを用いて、日本産トキ放鳥集団が保有しているDRD4の4種類の各ハプロタイプとの相関解析を行った結果(図(4)-12)、分散定着性とハプロタイプIVとの間で、ハプロタイプIVを持つ個体は分散距離が短距離になる傾向がみられた。また、採

餌行動性とハプロタイプIVとの間で、ハプロタイプIVを持つ個体は採餌回数が少なくなる傾向がみられた。さらに、生存性とハプロタイプIVとの間で、ハプロタイプIVを持つ個体は生存性が低くなる傾向がみられた。これにより、分散定着性、採餌行動性、生存性とハプロタイプIVとの間で関連性の傾向がみられた。

野生復帰トキ個体群を安定的に維持する上で、生存率の向上は重要であるため、生存性が低くなる傾向があるハプロタイプIVが、野生下の後代に伝播されないような放鳥個体の選定を行う必要があると考えられた。さらに、飼育下個体群でも、ハプロタイプIVの頻度を低くするような計画的な交配を行っていく必要があると考えられた。生存性はend phenotypeと考えられ、採餌行動性、分散定着性はintermediate phenotypeと考えられる。今回の結果から、DRD4多型が、採餌行動性、分散定着性のintermediate phenotypeを介して、生存性に影響すると考えられた。

### (5) SNPの多型情報の収集および遺伝的多様性の評価に関する研究

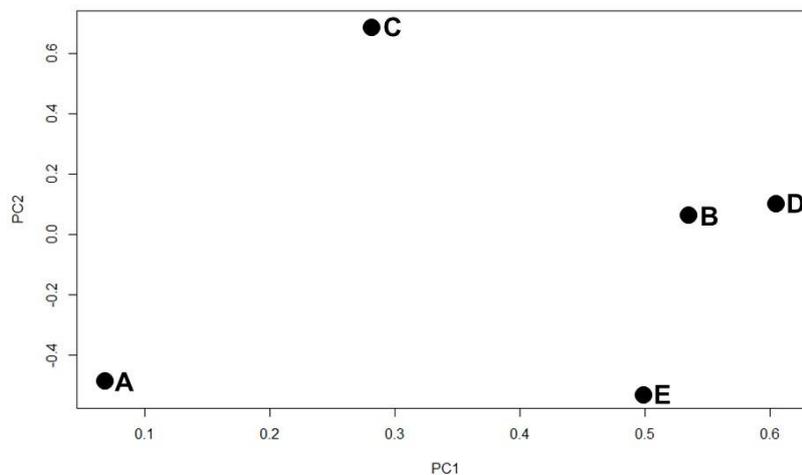
現在の日本トキ集団の始祖5個体を対象として、Reduced Representation Library (RRL)と次世代シーケンサーを組み合わせた手法により、DNA多型マーカーの大規模な開発を実施した。次世代シーケンシングにより全体で約30Gbの塩基配列データが得られ、データ解析の結果、52,512のSNP候補開発された(表(4)-5)。STRについては、162のSTR候補が開発されたが、155個が2アレルであり、3アレルのものはわずか7個であった。検出されたSNPおよびSTR候補のうち、32,157のSNP候補と86のSTR候補については、各始祖個体の遺伝子型データが得られた。SNP候補の遺伝子型データを使用した主成分分析などにおいては、著しくゲノムが類似するペアは検出されないものの(図(4)-13)、複数のSNP候補部位を含む202塩基の配列のハプロタイプ数(表(4)-6)やSTRのアレル数からは、ゲノム全域にわたり各座位でのアレル数は2~3であり、日本トキ集団の遺伝的多様性が極めて低いことが示唆された。

表(4)-5 次世代シーケンサーを利用したSNPの検出

	全 体	グループ		
		Both-end HaeIII	Both-end Mbol	Others
トリミング後総Read数	306,436,996			
Read-pair数	153,218,498	85,131,252	9,024,997	64,062,249
総Consensus配列数	31,418,852	4,175,097	952,879	26,290,876
Consensus配列数 (clustering depth $\geq$ 10)	1,754,793	465,471	249,515	1,039,807
Consensus配列数 (mapping depth $\geq$ 100 In total of 5 founders)	532,712	294,989	13,353	224,370
総SNP候補数	52,512	28,764	321	23,427
SNP候補数 (mapping depth $\geq$ 20 In each of 5 founders)	32,157	16,334	224	15,599

表(4)-6 複数のSNP部位を含むコンセンサス配列におけるハプロタイプ数

遺伝子座あたりの ハプロタイプ数	2	3	4	5	6
遺伝子座の数	2,750	1,054	258	13	5



図(4)-13 32,157個のSNP候補の遺伝子型データを使用した主成分分析

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

トキの保全および野生復帰事業においては、集団の遺伝的多様性の維持は重要な課題であり、その実現のためには飼育下や放鳥個体のみならず野外で誕生した個体に対してもDNA多型マーカーを利用した遺伝的管理を実施することが望ましい。本研究では、個体からのゲノムDNAの採取法の確立、飼育集団および放鳥集団でのSNP、マイクロサテライトマーカーによる遺伝的多様性の評価、行動形質、繁殖適応形質に関与するMHC領域やDRD4遺伝子のゲノム構造と多型の解析、それらの適応度遺伝子を用いた遺伝的多様性の評価、DRD4と行動形質、生活史形質との関連の解析において成果が得られた。これらの解析手法やデータは、トキ集団の遺伝的管理を実施するための基礎を成すものであり、今後の交配計画の策定や放鳥個体の選抜に対しても有用な情報となると期待される。

また、トキと同様に日本国内において保全および野生復帰事業が進められているコウノトリについて、MHCクラスII領域のゲノム構造およびその遺伝的多様性に関して成果が得られた。コウノトリのMHCクラスII領域のゲノム構造は、トキのものとはほぼ一致しており、ニワトリを含むキジ目のものとは大きく異なっていた。これらのデータは、鳥類のMHC領域の進化の研究に対しても重要な情報になると期待される。

### (2) 環境政策への貢献

#### <行政が既に活用した成果>

野外で標識する幼鳥から羽毛を2-3本抜くことで、遺伝的多様性の解析に十分なDNAが採取できることが確認されたことにより、野外産まれ個体の遺伝的多様性のモニタリング手法に目処が立った。この手法は、既に、放鳥トキのヒナ捕獲時に性別・遺伝子情報を得るための試料採取に用いられている。

### <行政が活用することが見込まれる成果>

- 1) 日本のトキの飼育個体群の遺伝的多様性は、中国個体群の6割強程度しかないことが確認できた。この研究成果に基づいて、分子マーカーを利用した継続的な遺伝的多様性評価を行っていくことで、繁殖能力や生存能力の低下阻止につながる近親交配の回避および遺伝的多様性の最大限の維持と拡大を目指した遺伝的管理を行うことが可能となる。
- 2) DRD4多型情報が放鳥後の生存率に影響を与えることが判明した。これをもとに、将来的にはDRD4多型情報を組み込んだ放鳥個体候補の選択方法が提案可能となる。

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

#### <論文(査読あり)>

- 1) Y. TANIGUCHI, H. MATSUDA, T. YAMADA, T. SUGIYAMA, K. HOMMA, Y. KANEKO, S. YAMAGISHI and H. IWASAKI: PLoS One, 8, e72781 (2013), Genome-wide SNP and STR discovery in the Japanese crested ibis and genetic diversity among founders of the Japanese population.
- 2) K. URANO, K. TSUBONO, Y. TANIGUCHI, H. MATSUDA, T. YAMADA, T. SUGIYAMA, K. HOMMA, Y. KANEKO, S. YAMAGISHI and H. IWASAKI: Zoolog. Sci, 30, 432-438 (2013), Genetic diversity and structure in the Sado captive population of the Japanese crested ibis.
- 3) K. KANEKO, E. UEMATSU, Y. TAKAHASHI, B. TONG, S. TAKINO, Y. WAJIKI, T. KIMURA, H. YAMASHIRO, Y. KANEKO, H. IWASAKI, T. SUGIYAMA, T. YAMADA and S. YAMAGISHI: Reprod. Domest. Anim, 48, 1001-1005 (2013), Semen collection and polymerase chain reaction-based sex determination of black-headed and straw-necked ibis.
- 4) K. TSUBONO, Y. TANIGUCHI, H. MATSUDA, T. YAMADA, T. SUGIYAMA, K. HOMMA, Y. KANEKO, S. YAMAGISHI and H. IWASAKI: Anim. Sci. J, 85, 356-364 (2014), Identification of novel genetic markers and evaluation of genetic structure in a population of Japanese crested ibis.
- 5) Y. WAJIKI1, Y. KANEKO, T. SUGIYAMA, T. YAMADA and H. IWASAKI: Jpn. J. Zoo Wildl. Med, 19, 57-67 (2014), Demographic Analyses in the Japanese Captive Population of Japanese Crested Ibis (*Nipponia nippon*).
- 6) Y. TANIGUCHI, K. MATSUMOTO, H. MATSUDA, T. YAMADA, T. SUGIYAMA, K. HOMMA, Y. KANEKO, S. YAMAGISHI, and H. IWASAKI: PLoS One, 9, e108506 (2014), Structure and polymorphism of the MHC class II region in the Japanese crested ibis (*Nipponia nippon*).
- 7) Y. KOMATSU, M. YAMASHITA, T. YAMADA, B. TONG, T. OHTA, T. SUGIYAMA, H. YAMASHIRO, Y. KANEKO, H. NAGATA, and H. IWASAKI: J. Anim. Genet, 42, 3-9 (2014), The nucleotide sequences for the dopamine receptor D4 gene in the Japanese crested ibis.

- 8) M. YAMASHITA, Y. KOMATSU, T. YAMADA, B. TONG, T. OHTA, T. SUGIYAMA, H. YAMASHIRO, Y. KANEKO, H. NAGATA and H. IWASAKI: J. Anim. Genet, 42, 65-69 (2014), Polymorphisms of the dopamine receptor D4 gene in the Sado population of the Japanese crested ibis.
- 9) Y. WAJIKI, Y. KANEKO, T. SUGIYAMA, T. YAMADA and H. IWASAKI: J. Poult. Sci, 53, 1-7 (2016), Genetic analyses in the Japanese captive population of Japanese crested ibis (*Nipponia nippon*) using pedigree information.
- 10) T. YAMADA, H. NAGATA, D. IKENORI, Y. TANIGUCHI, H. MATSUDA, T. OHTA, T. SUGIYAMA, K. HOMMA, Y. KANEKO and H. IWASAKI: Ornithol. Sci, (2016), Molecular assessment of genetic diversity in the Japanese population of the Japanese crested ibis. (in press)

#### <査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

#### <その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 浦野健介、坪野佳奈子、谷口幸雄、松田洋和、祝前博明、山田宜永、杉山稔恵、本間航介、金子良則、山岸哲：日本動物学会HPトピックス（2015）  
「日本産トキ集団における遺伝的多様性の評価」

#### (2) 口頭発表（学会等）

- 1) 伊藤史人、Tong Bin、山田宜永、祝前博明、杉山稔恵、本間航介、金子良則：第 51 回北信越畜産学会新潟県分会（2013）  
「佐渡島トキ集団のDRD4遺伝子の保存配列領域における多型検出およびハプロタイプ解析」
- 2) 坪野佳奈子、谷口幸雄、松田洋和、山田宜永、杉山稔恵、和食雄一、金子良則、山岸哲、祝前博明：日本畜産学会第 116 回大会（2013）  
「DNAマーカー情報を用いた日本トキ集団の遺伝的多様性の一評価」
- 3) 谷口幸雄、松田洋和、山田宜永、杉山稔恵、金子良則、祝前博明：日本畜産学会第 116 回大会（2013）  
「次世代シーケンサーを利用したトキDNA多型マーカーの大規模開発 1) ストラテジーおよびシーケンスデータの概要」
- 4) 祝前博明、谷口幸雄、松田洋和、山田宜永、杉山稔恵、金子良則：日本畜産学会第 116 回大会（2013）  
「次世代シーケンサーを利用したトキDNA多型マーカーの大規模開発 2) データ処理およびDNA多型の検出」
- 5) 谷口幸雄、松田洋和、山田宜永、杉山稔恵、金子良則、祝前博明：日本畜産学会第 117 回大会（2013）  
「多数のSNPマーカーを用いたトキ始祖個体間の遺伝的多様性の解析」
- 6) 轡田美紀、山田宜永、杉山稔恵、市村有理、金子良則、祝前博明：第 62 回北信越畜産学会大会（2013）  
「野生下のトキヒナからのDNAサンプリング法」

- 7) 関口渚、Tong Bin、小松優太、金子良則、市村有理、祝前博明、山田宜永：第 52 回北信越畜産学会新潟県分会（2014）  
「佐渡島トキ集団におけるマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝的多様性の検討」
- 8) 松本啓佑、谷口幸雄、松田洋和、山田宜永、杉山稔恵、本間航介、金子良則、山岸哲、祝前博明：日本畜産学会第 118 回大会（2014）  
「トキMHCクラスII領域のゲノム構造とその多様性」
- 9) H. IWASAKI、H. MATSUDA、Y. TANIGUCHI、T. YAMADA、T. SUGIYAMA、Y. KANEKO：The 10th Asia Pacific Poultry Conference（2014）  
「Genomic relatedness among founders assessed using putative SNP data in the Japanese population of the Japanese crested ibis」
- 10) 松本啓佑、谷口幸雄、松田洋和、山田宜永、杉山稔恵、本間航介、金子良則、山岸哲、祝前博明：日本畜産学会第 119 回大会（2015）  
「トキMHCクラスI領域のゲノム構造の解析」
- 11) 辻浩基、石塚真太郎、谷口幸雄、松田洋和、内藤和明、祝前博明：日本畜産学会第 119 回大会（2015）  
「コウノトリ MHC 領域のゲノム構造の解析および次世代シーケンサーを用いた全塩基配列決定の試み」
- 12) 池乗及智、Tong Bin、金子良則、市村有理、永田尚志、祝前博明、山田宜永：第 53 回北信越畜産学会新潟県分会（2015）  
「佐渡島トキ集団における DRD4 遺伝子の保存領域での多型検出および警戒心形質との相関解析」
- 13) 池乗及智、永田尚志、高橋雅雄、杉山稔恵、金子良則、祝前博明、山田宜永：日本畜産学会第 121 回大会（2016）  
「日本産トキ集団における DRD4 遺伝子と生存率、行動特性との関連解析」

### （3）出願特許

特に記載すべき事項はない。

### （4）「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

### （5）マスコミ等への公表・報道等

- 1) 新潟日報2014年12月28日朝刊に掲載  
「国内トキの遺伝的多様性 低さ証明」

### （6）その他

- 1) 日本動物学会Zoological Science Awardおよび藤井賞の受賞

「Genetic diversity and Structure in the Sado captive population of the Japanese crested ibis」

## 8. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

## **Studies on the reintroduction process of endangered birds to improve its success from captive population.**

Principal Investigator: Hisashi NAGATA

Institution: Institute of Research Promotion, Niigata University  
8050 Ikarashi-Ninocho, Nishi-ku, Niigata, Niigata  
9502181, JAPAN  
Tel: +81-25-262-7639 / Fax: +81-25-262-7639  
E-mail: hnagata@gs.niigata-u.ac.jp

Cooperated by:, University of Hyogo, Yamashina Institute of Ornithology

### [Abstract]

**Key Words:** endangered birds, reintroduction, survival rate, captive breeding, population management, breeding success, genetic diversity, *Nipponia nippon*, *Ciconia boyciana*, *Gallirallus okinawae*

Reintroduction success from captive breeding for endangered bird species is quite low, so far. In order to clarify reintroduction process, we studied how behavioral traits and experience in captivity and genetic traits will affect survival and breeding success after reintroduction for 3 endangered bird species, oriental white stork *Ciconia boyciana*, crested ibis *Nipponia nippon*, and Okinawa rail *Gallirallus okinawae*, which are under ongoing reintroduction programs. We developed databases of captive and reintroduced populations of the oriental white stork and crested ibis by combing individual information, case history in captivity, ecological information following release. Survival of reintroduced ibis was affected by age, rearing manner, and case history in captivity. Parents-reared birds experienced higher survival and adaptability both in the captivity and in the wild than hand-reared ones. We can enhance the chance of reintroduction success for the ibis by releasing only young and parent-raised birds. Genetic analyses based on microsatellite DNA marker and pedigree information were performed in the stork. The candidate individuals for pairing or releasing were identified to enhance the genetic diversity. We analyzed the factors affecting reintroduction process and the requirements for local colonization. We proposed the methodology both to establish and to manage a local population for the stork.

Statistical model revealed that the decline of Okinawa Rail *Gallurallus okinawae* was responsible for the presence of invasive mongoose. Then, mongoose eradication is the top priority for conserving rails. Capture and tracking techniques, necessary for re-introduction of captive bred individuals, were developed. Bow-net was effective in capture. Audio lure and decoy of a natural enemy snake were both effective in attracting

birds. Small radio transmitters attached with backpack harness were inevitable for tracking. Rails experimentally released into the wild experienced high mortality due to predation. To improve survival following release, pre-release training against potential predators is required.

For conservation of small populations of endangered birds, a major concern is loss of genetic diversity through genetic drift and inbreeding. We established genetic study tool and protocol, and assessed genetic diversity in the bird populations based on the SNP and microsatellite as neutral marker, and polymorphisms of MHC region and DRD4 as functional marker. We found ibis showed considerably low level of genetic diversity resulting from bottleneck. Further, we found that the DRD4 polymorphisms are associated with survival and behavioral trait. These results will provide important information on establishment of genetic monitoring for management of conservation of the endangered birds.